

THESE
DE
DOCTORAT D'ETAT
ES-SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE
A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

PAR
Maryse CAMIER
pour obtenir le grade de Docteur Es - Sciences

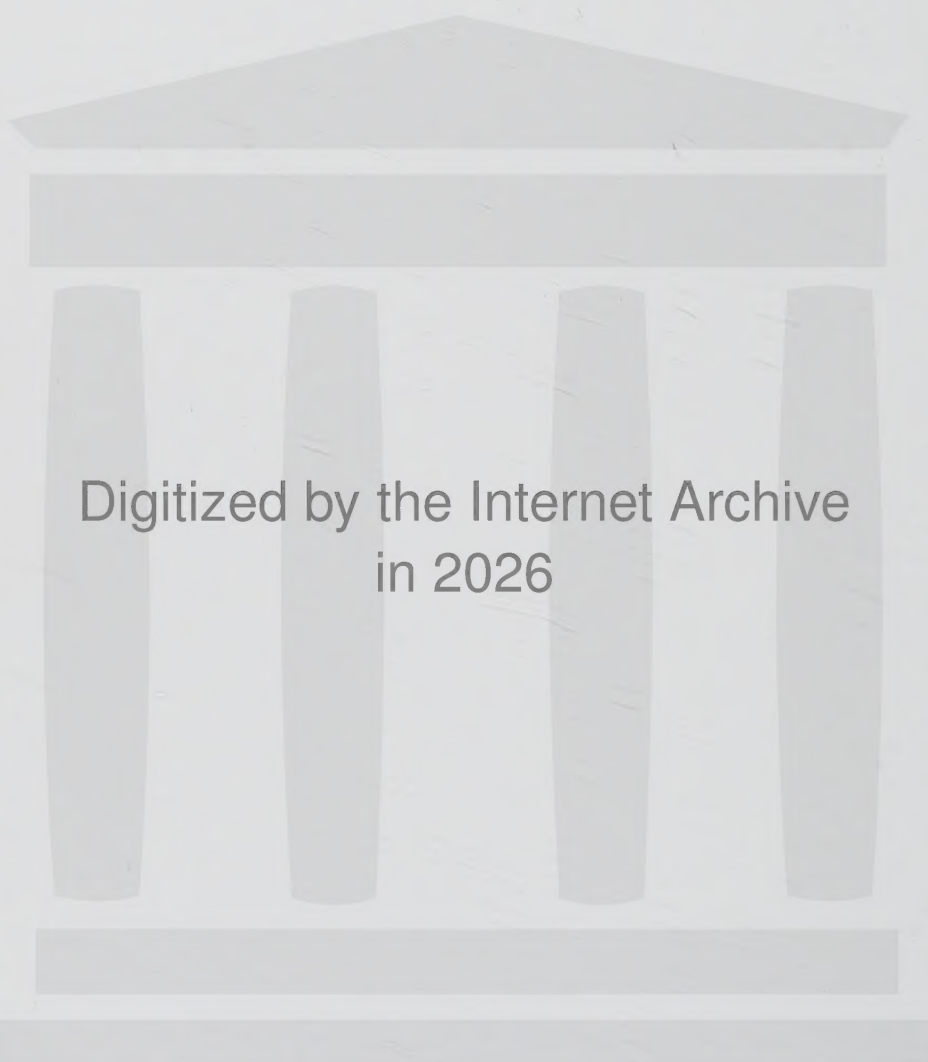
Sujet de la Thèse :

ETUDE DU ROLE COENZYMATIQUE DE
DERIVES DU PHOSPHO-5 PYRIDOXAL

soutenue le 18 JUIN 1970 devant la Commission d'Examen

M. DUBERT
Président,

MM. GOLDBERG, MESTER, GONNARD
Examineurs,



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550217_0009

THESE
DE
DOCTORAT D'ETAT
ES-SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE
A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

PAR
Maryse CAMIER

pour obtenir le grade de Docteur Es - Sciences

Sujet de la Thèse :

ETUDE DU ROLE COENZYMATIQUE DE
DERIVES DU PHOSPHO-5 PYRIDOXAL

soutenue le 18 JUIN 1970 devant la Commission d'Examen



AUX MIENS

Avant d'exposer ce travail, je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à ceux qui m'ont permis de le réaliser.

A Monsieur le Professeur J.M. DUBERT qui s'est vivement intéressé à cette étude et qui m'a incitée à la poursuivre.

A Monsieur le Professeur L. MESTER qui a toujours considéré ce travail avec beaucoup de bienveillance et qui m'a aidée par ses précieux conseils.

A Monsieur le Professeur M. GOLDBERG qui m'a permis d'achever ce travail en guidant mes recherches avec méthode et compétence et qui m'a témoigné beaucoup de sollicitude.

A Monsieur le Professeur P. GONNARD à qui je dois de présenter ce travail. Il m'a fait découvrir la biochimie et, en me donnant l'exemple de son enthousiasme pour la recherche, a décidé de mon orientation.

Enfin, que Monsieur le Professeur J. MONOD me permette de le remercier. En me donnant la possibilité de travailler dans son service il m'a fait bénéficier de l'ambiance si stimulante qui y règne.

ABBREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

AET	bromure d' amino-éthyl isothio-urée
DEAE-sephadex	diéthylaminoéthyl sephadex
diméthyl POPOP	bis- [(méthyl-4 phényl-5 oxazoly1)-2] 1,4 benzène
DOPA	dihydroxy-3,4 L-phénylalanine
EDTA	éthylène diamine tetra acétate de sodium
5-HTP	hydroxy-5 tryptophane
INH	isonicotylhydrazide ou isoniazide
INHPLP	isonicotylhydrazone de phospho-5 pyridoxal
β-ME	β-mercaptoéthanol
PLP	phospho-5 pyridoxal
PMP	phospho-5 pyridoxamine
PPO	bis- phényl-2,5 oxazole
tris	amino-2 hydroxyméthyl-2 propane diol-1,3

Les abréviations et les noms triviaux des enzymes étudiées sont indiqués au chapitre I.

Nomenclature -

Les dérivés du PLP sont désignés par les termes: hydrazone, imine, oxime de PLP. Nous avons préféré ces dénominations aux noms systématiques car elles évoquent le mode de préparation des dérivés.

Exemple : " semicarbazone de PLP " au lieu de (phospho-5 pyridoxylidène)-1 semicarbazide.

Introduction

L'utilisation en thérapeutique antituberculeuse de l'hydrazide isonicotinique ou isoniazide (INH) a suscité de nombreuses recherches, aussi bien dans le domaine de la physiologie que dans celui de la biochimie.

De 1954 à 1957 un certain nombre de travaux mirent en évidence l'action inhibitrice de l'INH sur des enzymes comportant le phospho-5 pyridoxal (PLP) comme cofacteur (10, 134, 82, 83, 23).

L'hydrazide isonicotinique étant un réactif de la fonction aldéhyde, cette inhibition a été interprétée comme la conséquence de la formation d'une fonction hydrazone bloquant la fonction aldéhyde du PLP (29, 39, 73, 95).

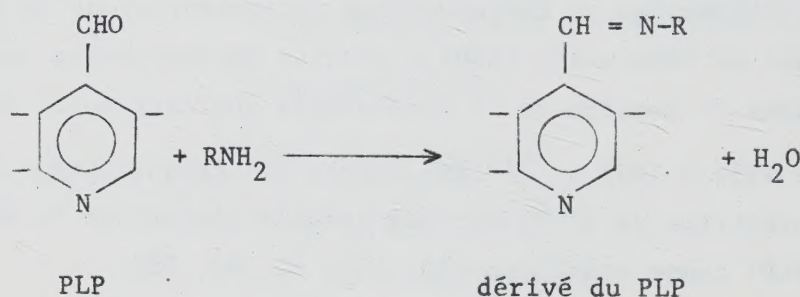
En 1958, Gonnard et Nguyen Chi observent qu'à faible concentration l'hydrazide isonicotinique non seulement n'inhibe pas l'activité DOPA décarboxylasique d'une préparation de reins de cobayes mais au contraire l'active (62). Presque simultanément Bonavita et Scardi (19), Palm (104) constatent le même phénomène.

Gonnard et coll. préparent alors l'isonicotylhydrazone de phospho-5 pyridoxal (INHPLP) et montrent qu'elle active effectivement la décarboxylation enzymatique de la DOPA (50, 63).

Les auteurs effectuent la synthèse de nombreux dérivés du PLP et étudient leur action sur plusieurs enzymes pyridoxaliques. La plupart des composés se révèlent capables de remplacer le PLP dans son rôle coenzymatique (64, 65, 52, 60, 58, 57, 54, 53, 56, 59).

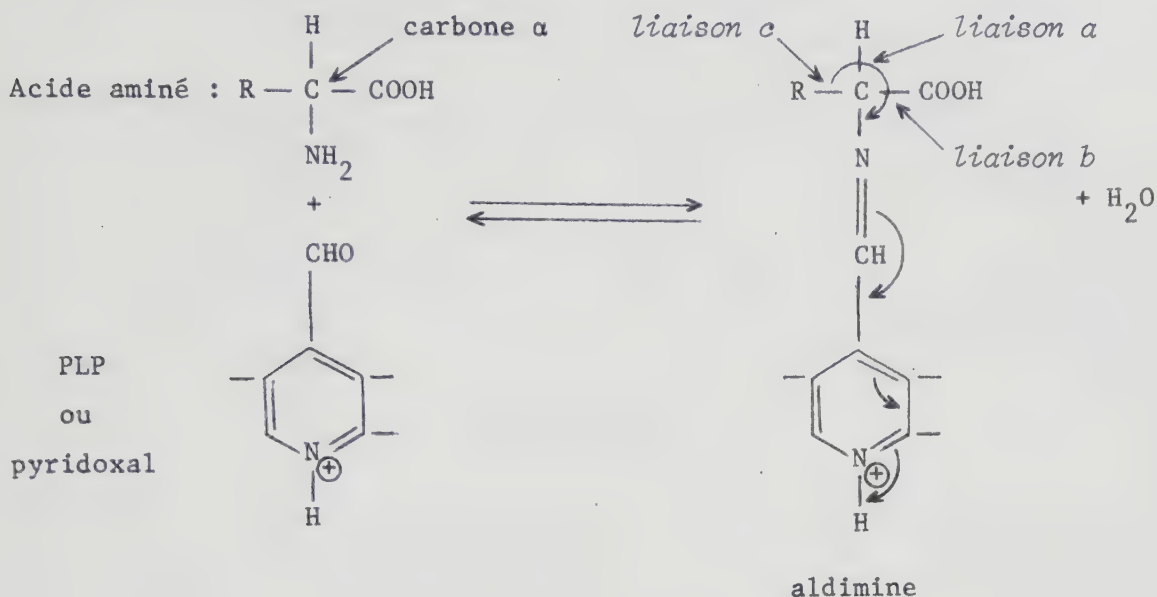
Dans le même temps, d'autres chercheurs effectuent des travaux analogues et confirment le rôle coenzymatique des dérivés du PLP (91, 92, 126, 5).

Ces résultats mettent en cause le mécanisme par lequel le PLP intervient dans les réactions enzymatiques. En effet, tous les dérivés étudiés : *aldimines*, *oxime*, *hydrazones*, proviennent de la combinaison de la fonction aldéhyde du PLP avec un composé ayant un groupe $-NH_2$: *amines*, *hydroxylamine*, *hydrazines*, *hydrazides*. Leur structure est telle que la théorie de Braunstein et de Snell concernant le mode d'action du PLP ne peut leur être appliquée.



Il convient de rappeler cette théorie proposée indépendamment par Braunstein et Shemyakin (24) et par Metzler, Ikawa et Snell (99). Ce deuxième groupe de chercheurs a étudié la catalyse exercée par le pyridoxal sur des réactions modèles réalisées en milieu non enzymatique.

La 1^{ère} étape de la catalyse pyridoxalique est la formation d'une *aldimine* ou *base de Schiff* entre l'acide aminé substrat et le PLP ou le pyridoxal :



Dans la base de Schiff, les électrons des liaisons a , b et c du carbone α de l'acide aminé ont tendance à se déplacer vers l'azote protonisé du noyau pyridinique du PLP ou du pyridoxal (le mouvement des électrons est indiqué par les flèches). Il s'ensuit que les liaisons a , b et c sont affaiblies et que l'acide aminé est activé.

La 2^{ème} étape est le départ d'un des groupes portés par le carbone α de l'acide aminé :

départ du groupe - COOH	= décarboxylation
départ de l'atome d'hydrogène	= transamination
	racémisation
départ du groupe - R	= dégradation des
	β hydroxyaminoacides

La spécificité de la réaction peut être attribuée à l'enzyme ou, dans le cas des réactions modèles, à d'autres facteurs :

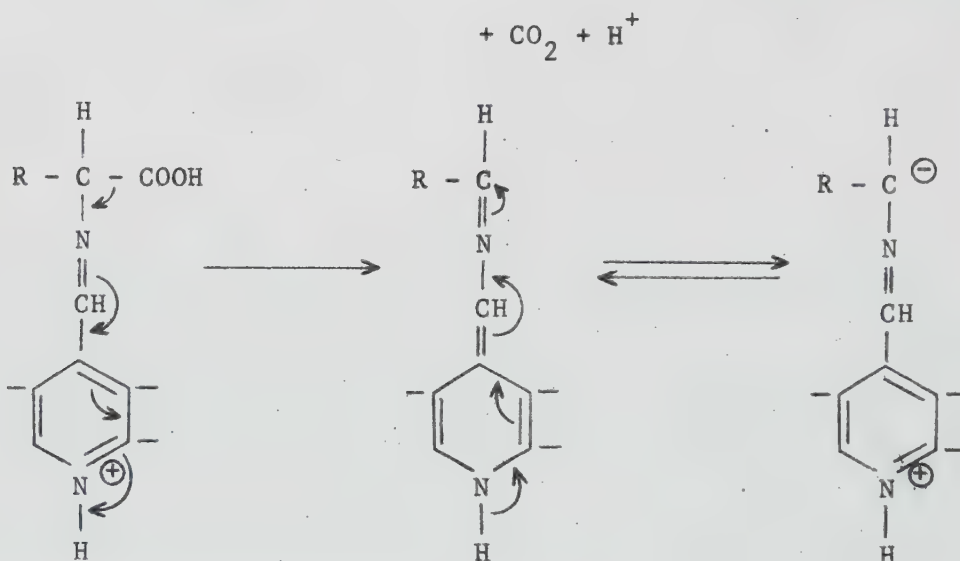
ions métalliques, pH, force ionique ...

Le départ du groupe labile est suivi immédiatement d'un réarrangement électronique qui a pour effet de déterminer la localisation d'une paire d'électrons :

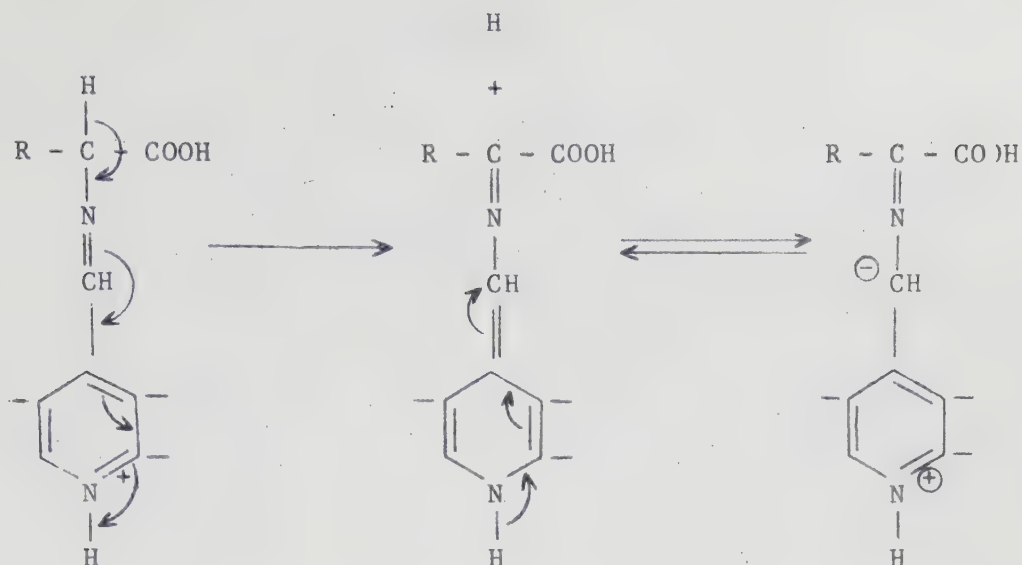
soit sur le carbone α de l'acide aminé : cas d'une décarboxylation ou d'une racémisation

soit sur le carbone aldéhydique du PLP ou du pyridoxal (cas d'une transamination).

Décarboxylation

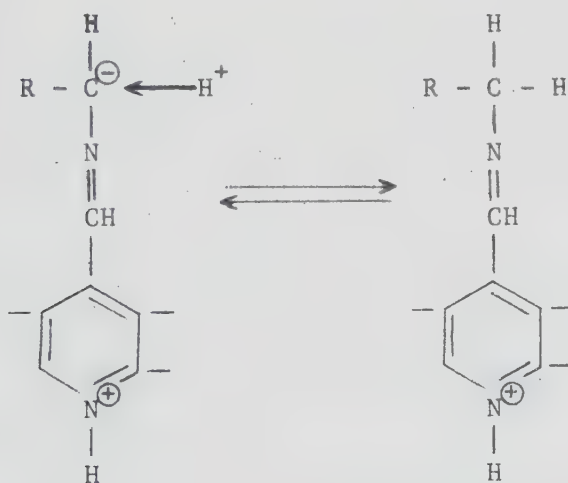


Transamination

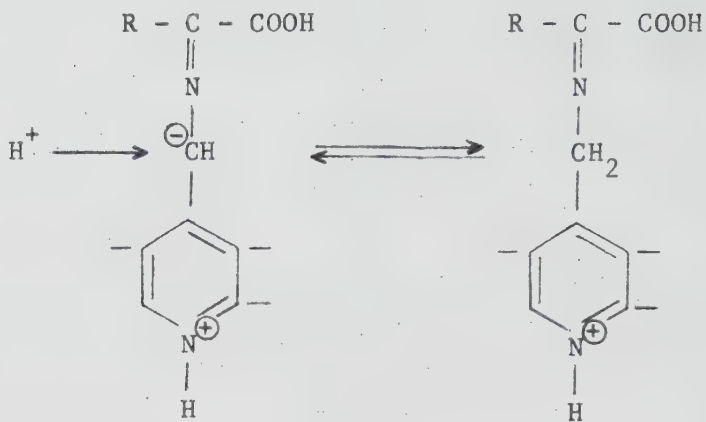


La 3ème étape consiste en la fixation d'un proton sur le carbone qui porte la paire d'électrons.

Décarboxylation

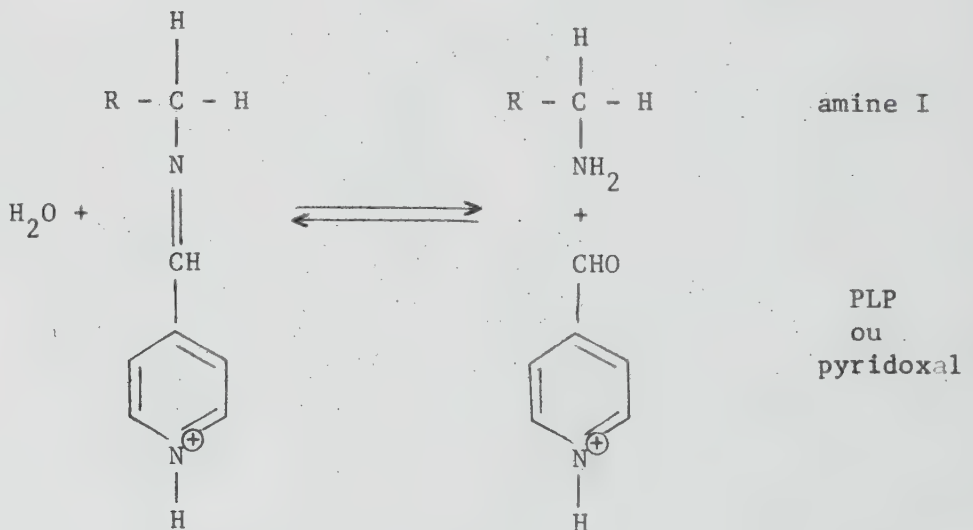


Transamination

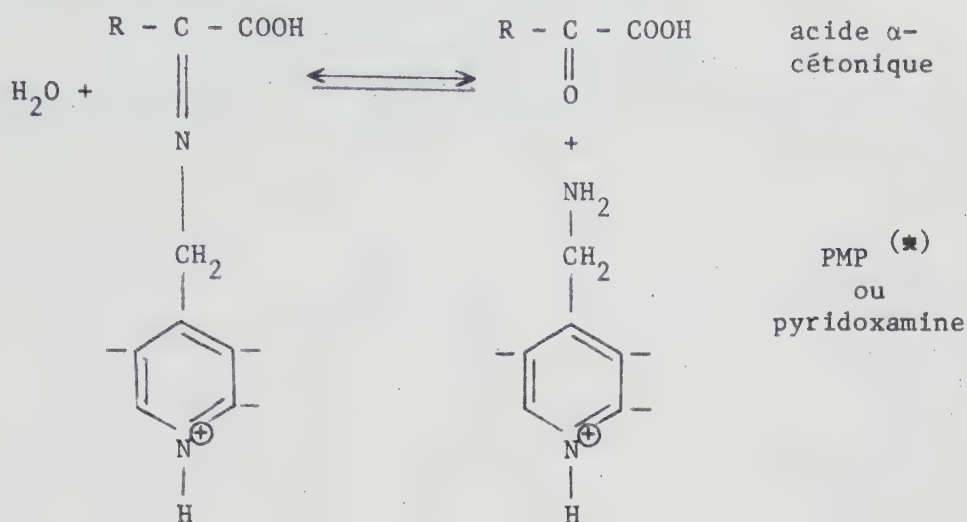


La protonisation est suivie de l'hydrolyse de la liaison $>\text{C} = \text{N}-$, qui libère les produits de la réaction.

Décarboxylation



Transamination

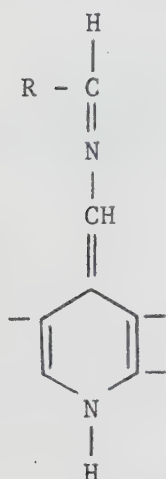


Cette théorie de la catalyse pyridoxalique est en accord avec les faits expérimentaux et est adoptée par la plupart des biochimistes. Cependant Pullman en a critiqué certains principes fondamentaux. Alors que Braunstein et Snell considèrent que le fait essentiel de la catalyse réside dans l'existence d'un système de doubles liaisons conjuguées dans la molécule d'aldimine formée entre l'acide aminé et le PLP (ou le pyridoxal), Pullman fait remarquer que le carbone α de l'acide aminé qui participe à la catalyse ne fait pas partie initialement du système conjugué. En outre, il fait une deuxième critique concernant la charge électronique du carbone α . Il considère que cette charge ne diminue pas au début de la catalyse mais qu'elle augmente (109).

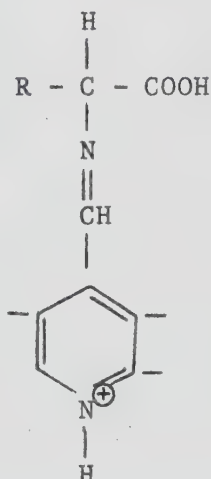
Ces deux objections amènent Pullman à proposer un mécanisme légèrement différent de celui de Braunstein et de Snell.

(*) PMP = phospho-5 pyridoxamine

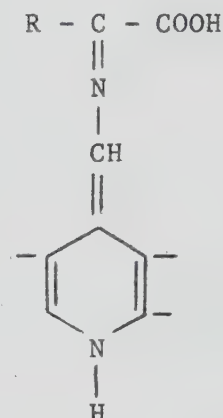
Pullman suggère que la transformation de la " base de Schiff originelle ", formée entre l'acide aminé et le PLP (ou le pyridoxal), en une "base de Schiff transitionnelle" s'accompagne d'un gain d'énergie de résonance. En effet, la forme transitionnelle correspond à un système conjugué plus grand que celui de la forme originelle. Il attribue au gain d'énergie de résonance la responsabilité de l'activation de l'acide aminé.



base de Schiff
transitionnelle
(décarboxylation)



base de Schiff
originelle



base de Schiff
transitionnelle
(transamination)

Ainsi les modifications apportées par Pullman sont d'ordre purement théorique et ne mettent pas en doute le mécanisme de la catalyse pyridoxalique proposée par Braunstein et par Snell.

En première analyse, il apparaît que la théorie de Braunstein et de Snell ne peut s'appliquer aux dérivés du PLP. Nous avons vu que pendant la réaction enzymatique le PLP intervient par sa fonction aldéhyde. Or les dérivés du PLP ne possèdent pas de fonction aldéhyde libre. Par conséquent, ils ne peuvent pas se comporter comme le fait le PLP à moins d'être instables et de régénérer du PLP. Si les dérivés sont stables, il faut admettre qu'ils agissent selon un autre mécanisme et, dans ce cas, la théorie de Braunstein et de Snell est à reconsidérer.

L'intérêt de ces composés apparaît clairement : l'étude de leur comportement au cours des réactions enzymatiques doit permettre de confirmer ou d'infirmer la théorie classique du fonctionnement du PLP. En effet, deux hypothèses peuvent être envisagées :

1ère hypothèse - Les dérivés du PLP sont de véritables coenzymes qui agissent par eux-mêmes. Ils sont stables.

2ème hypothèse - Les dérivés du PLP doivent leur activité au PLP qu'ils libèrent pendant la réaction enzymatique. Ils sont instables.

La confirmation de l'une ou de l'autre de ces hypothèses dépend de la stabilité des dérivés.

Au cours de ce travail, nous nous sommes proposée d'étudier la stabilité des dérivés du PLP pendant la catalyse enzymatique.

Avant d'aborder le problème du mécanisme d'action des dérivés du PLP, nous avons étudié les activités de certains d'entre eux vis-à-vis d'enzymes pyridoxaliques afin, d'une part, de les comparer au PLP et, d'autre part, de rechercher leurs activités différentielles vis-à-vis des enzymes considérées.

Nous exposerons notre travail selon le plan suivant : après avoir décrit le matériel et les méthodes utilisées (chapitre I) nous indiquerons comment nous avons réalisé la synthèse des dérivés étudiés et nous donnerons certains de leurs caractères physiques (chapitre II). Nous décrirons ensuite les méthodes de mesure de l'activité de la DOPA décarboxylase et sa purification (chapitre III). Nous avons réservé une place particulière à la DOPA décarboxylase car au début de ce travail, nous envisagions d'effectuer toutes les expériences concernant le mécanisme d'action des dérivés du PLP avec cette enzyme. Les autres enzymes étudiées seront décrites au chapitre I. Puis nous donnerons les résultats que nous avons obtenus en faisant agir les dérivés synthétisés sur les enzymes choisies (chapitre IV). Enfin, le chapitre V sera consacré à l'étude du mécanisme d'action des dérivés du PLP.

Chapitre I

MATERIEL ET METHODES

Solutions tampons.-

Solutions tampons de phosphates - Les solutions tampons de phosphates sont préparées à partir d'une solution de phosphate disodique 0,1M et d'une solution de phosphate monopotassique 0,1M. Le domaine de pH utilisable à l'aide de ces solutions est compris entre 5,5 et 9 (voir figure 1).

Solutions tampons de tris - Le tris est dissous dans l'eau distillée. Le pH de la solution est ajusté à la valeur désirée par addition d'acide chlorhydrique normal et le volume est complété à 1000 ml avec de l'eau distillée. Le pH des solutions tampons utilisées est compris entre 7 et 7,8.

Le pH et la concentration des solutions tampons^{de} phosphates et de tris employées dans les différentes expériences seront indiqués dans le texte.

Mesure des concentrations de protéines.-

Les concentrations de protéines sont déterminées par la méthode de Warburg et Christian (132) pour toutes les préparations enzymatiques sauf pour la Tryptophane synthétase B_2 . La concentration de la tryptophane synthétase B_2 est calculée à partir du coefficient d'extinction spécifique de la sous-unité B_2 à 278 nm (47).

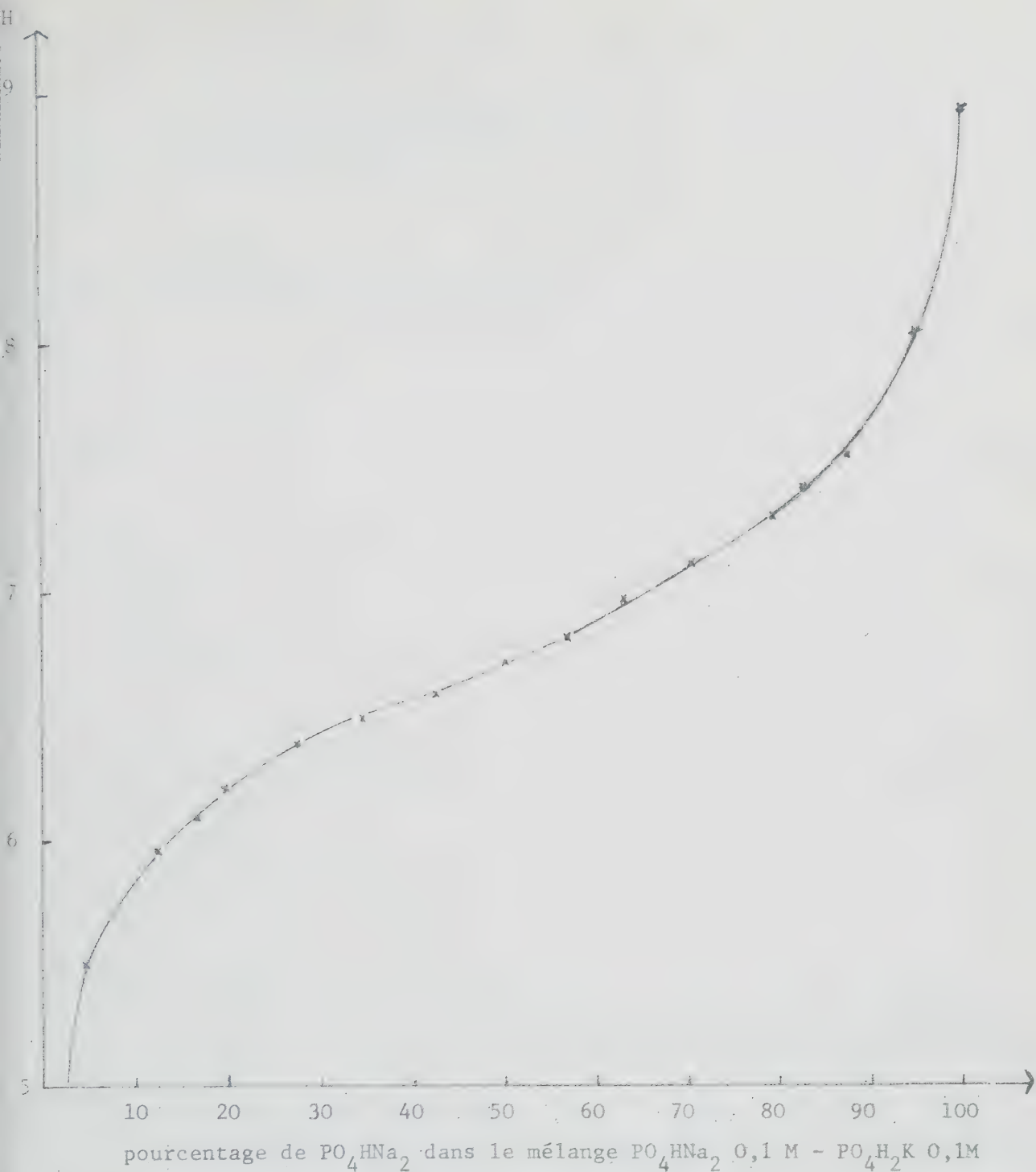


Fig. 1.- Solutions tampons de phosphates.

pH du mélange PO_4HNa_2 0,1 M -

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,1 M en fonction du pourcentage de PO_4HNa_2 0,1 M.

Le pH est déterminé à 20°C.

Origine des préparations enzymatiques et dosage des activités enzymatiques.-

1°) L-Tyrosine carboxy-lyase 4.1.1.25 : *Tyrosine décarboxylase*.

Nous avons utilisé deux préparations :

a) une poudre acétonique de *Streptococcus faecalis* (Sigma) contenant de la tyrosine décarboxylase non privée de PLP,

b) une préparation de *Streptococcus faecalis* cultivés sur un milieu exempt de vitamine B₆ contenant de l'apotyrosine décarboxylase (Sigma).

Dosages - Ils sont effectués par la méthode manométrique, soit dans les conditions indiquées par Gunsalus (68), soit dans les conditions suivantes : milieu tamponné à pH 7,4 - L-tyrosine $2,2 \cdot 10^{-3}$ M. Dans ce dernier cas, le CO₂ est libéré en fin de réaction par addition d'acide sulfurique 3,6 N.

2°) Dihydroxy-3,4 L-phénylalanine carboxy-lyase 4.1.1.26 : *DOPA décarboxylase*.

La préparation et le dosage de la DOPA décarboxylase feront l'objet du chapitre III.

3°) Hydroxy-5 L-tryptophane carboxy-lyase 4.1.1.28 : *Hydroxytryptophane décarboxylase* - (*5-HTP décarboxylase*).

La DOPA décarboxylase catalyse la décarboxylation de l'hydroxytryptophane.

Nous avons utilisé les préparations de DOPA décarboxylase correspondant à l'étape II de la purification (chapitre III).

Dosage - Il est effectué par la méthode manométrique dans les conditions décrites pour la DOPA décarboxylase (chapitre III). La L-DOPA est remplacée par l'hydroxy-5 L-tryptophane (concentration dans le milieu de réaction = $4 \cdot 10^{-3}$ M).

4°) L-Sérine hydro-lyase 4.2.1.20 : *Tryptophane synthétase* - (*Tsas*).

Nous avons utilisé la sous-unité β_2 qui a été préparée par le Dr. M. Golberg qui a bien voulu nous fournir cette enzyme pour réaliser l'étude du mécanisme d'action des dérivés du PLP.

Dosage - L'activité enzymatique a été mesurée par la méthode de Smith et Yanofsky (119) en utilisant de l'indol marqué au ^{14}C .

5°) L-Aspartate : oxo- 2 glutarate aminotransférase 2.6.1.1. : *Aspartate aminotransaminase* - (*AAT*).

Nous avons utilisé l'AAT (A grade) préparée par Sigma à partir de coeurs de porc et conservée en suspension dans une solution de sulfate d'ammonium 3 M contenant du cétoglutarate (0,0025 M) et du maléate (0,05 M).

Dosage - Le dosage a été réalisé selon la méthode de Banks et Vernon (9, 8) légèrement modifiée.

L'activité transaminasique est déterminée en mesurant l'acide oxaloacétique formé à partir d'aspartate et de cétoglutarate de sodium dans les conditions suivantes : 3 ml de solution tampon de phosphates 10^{-1}M pH 7,4 renfermant de l'aspartate de sodium (10 μmoles) et du cétoglutarate de sodium (10 μmoles) sont placés dans la cuve "échantillon" d'un spectrophotomètre Beckman D.B. La cuve "référence" contient la même solution. Les deux cuves sont thermostatées à 37°C. Au temps zéro du dosage, l'enzyme est introduite dans la cuve "échantillon" à l'aide d'une seringue Hamilton de 10 μl . La densité optique à 260 nm est enregistrée immédiatement; elle est proportionnelle à la quantité d'acide oxaloacétique présente dans le milieu. C'est la forme énoï de l'acide oxaloacétique qui est responsable de l'absorption à 260 nm. L'enregistrement fournit une courbe représentant la variation de la densité optique en fonction du temps. La tangente à l'origine donne la vitesse initiale de la réaction (v_i). La vitesse initiale peut être exprimée en concentration d'acide oxaloacétique formé. Le coefficient d'extinction moléculaire de l'acide oxaloacétique, dans les conditions du dosage, est égal à 10^3 .

Préparation de l'apotransaminase - La résolution de la forme pyridoxamine de l'AAT est plus facile à obtenir que celle de la forme pyridoxal. La préparation de l'apotransaminase est donc réalisée en deux étapes :

a) - préparation de la forme pyridoxamine à partir de l'enzyme fournie par Sigma selon la méthode décrite par Jenkins et Sizer (81)

b) - résolution de l'AAT forme pyridoxamine selon la technique préconisée par Wada et Snell (131).

Nous avons ainsi obtenu une préparation privée de coenzyme à 95 p. 100.

Mesures spectrophotométriques.-

Spectrophotomètre Unicam S.P. 500 - Les mesures ont été effectuées avec des cuves en silice ayant une capacité de 3 ml ou avec des microcuves, également en silice, d'un volume égal à 400 μ l.

Spectrophotomètre Beckman, modèle D.B. - Cet appareil muni d'un enregistreur permet à la fois de déterminer des spectres et de réaliser des mesures cinétiques. Le compartiment qui reçoit les cuves peut être thermostaté. Les mesures ont été effectuées avec des cuves en silice modèle standard (volume = 3 ml) et des microcuves à fenêtre en silice (volume = 60 μ l).

Quelque soit le spectrophotomètre utilisé et les cuves employées, le trajet lumineux à travers la solution absorbante est toujours égal à 1 cm.

Centrifugations.-

Elles ont été effectuées avec une centrifugeuse MSE High Speed 18.

Chromatographie et filtration sur colonne.-

Matériel

Colonnes - Nous avons utilisé plusieurs types de colonnes :

- colonnes fabriquées par Pharmacia K 9/30 - K 15/30 - K 25/45
- colonnes ordinaires munies d'un robinet à la partie inférieure :

longueur = 60 cm, diamètre = 1 cm

" 35 " " 1 "

" 30 " " 1,8 cm

Pompe péristaltique fabriquée par Technicon

Collecteur de fractions Seive muni d'un détecteur de gouttes

Collecteur de fractions Towers équipé d'un plateau spécial pour flacons à scintillation

Mode opératoire

1°) Préparation du gel.-

Gels de sephadex G-10 et G-25 : le sephadex G-10 et le sephadex G-25 "fine", fournis par Pharmacia, sont mis à gonfler dans la solution tampon de phosphates ou de tris pendant au minimum 3 heures à la température du laboratoire, avant l'emploi. Un gramme de sephadex G-10 absorbe environ 1 ml de solution et un gramme de sephadex G-25 "fine" environ 2,5 ml.

DEAE - sephadex A-50 (perles) : cet échangeur d'ions est préparé par Pharmacia sous forme de chlorures. Il est mis à gonfler pendant 24 heures dans du tampon tris $5 \cdot 10^{-2} M$, pH 7, 0,044 N en Cl^- , puis il est équilibré avec le même tampon par lavages successifs jusqu'à ce que le pH et la concentration en Cl^- du filtrat soient égaux à ceux du tampon.

Resine Dowex I (8 X - 100-200 mesh) : la résine est fournie par Dow Chemical Company sous forme de chlorures. Pour l'obtenir sous forme de formiate, il est nécessaire de la laver avec une solution de formiate de sodium 1 M jusqu'à élimination des chlorures. La résine est ensuite mise en suspension dans du tampon tris 2.10^{-2} M amené à pH 7,7 par addition d'acide formique. Cette résine est utilisée pour la préparation de la transaminase pyridoxamine.

2°) Préparation de la colonne.-

La colonne est remplie au quart de sa hauteur de solution tampon puis le gel est versé avec précaution. Après sédimentation du gel on fait passer un volume de solution tampon égal à deux fois le volume du gel.

Pour le DEAE - sephadex on vérifie que le pH et la concentration en Cl^{-} de l'éluat sont identiques à ceux du tampon utilisé: tris 5.10^{-2} M, pH 7, 0,044 N en Cl^{-} .

3°) Elution.-

Elle est réalisée en chambre froide. L'éluant : tampon de phosphates ou tris, est amené au sommet de la colonne à l'aide de la pompe péristaltique qui en même temps règle le débit de l'éluat. Celui-ci est recueilli et fractionné par le collecteur.

Filtration de substances radioactives.-

Nous avons réalisé des filtrations de molécules marquées au ^{14}C .

L'éluat radioactif est directement recueilli dans les flacons de mesure de radioactivité. Les fractions d'un volume égal à 1 ml sont évaporées à sec dans une étuve ventilée réglée à $100^{\circ}C$.

Si la filtration est effectuée en tampon de tris, le résidu est dissous dans 0,2 ml de méthanol puis la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation Packard TRI-CARB en présence du mélange scintillant A (10 ml).

Si la filtration est effectuée en tampon de phosphates le résidu est dissous dans 0,2 ml d'eau distillée puis la radioactivité est mesurée en présence de 10 ml de mélange scintillant B.

En outre les fractions contenant des protéines sont traitées par 0,2 ml de solution molaire d'hydroxyde d'hyamine dans le méthanol.

Les flacons sont disposés dans l'enceinte réfrigérée du compteur à scintillation 15 minutes avant la mesure. Le temps de comptage est de 10 minutes avec le mélange scintillant A et de une minute avec le mélange scintillant B qui contient du dioxanne et se congèle rapidement. Les mesures sont répétées au moins une fois.

<i>mélange scintillant A :</i>	PPO	3 g
	diméthyl POPOP	0,1 g
	toluène q. s. p.	1 litre

<i>mélange scintillant B :</i>	PPO	4 g
	diméthyl POPOP	0,1 g
	naphtalène	50 g
	dioxanne q. s. p.	1 litre

Chromatographie en couches minces. (CCM)

Les chromatographies en couches minces ont été réalisées selon la méthode de Stahl (121). Nous avons utilisé le matériel fabriqué par Desaga, notamment un étaleur de gel qui permet d'obtenir des couches de 0,25 mm d'épaisseur.

1°) composition des couches adsorbantes.-

gel de silice : nous avons préparé ce gel avec de la silice contenant un agent liant (Gypse) :

silice G (Merck)	30 g
eau distillée	60 ml

le gel étalé sur les plaques est séché, à l'air libre, à la température ambiante (41).

Nous avons aussi utilisé des plaques de gel de silice préparées par les laboratoires Merck.

gel de cellulose : nous avons employé les plaques préparées par les laboratoires Merck.

2°) solvants.-

solvant A : n-butanol - acide acétique - eau (6 : 2 : 2, v/ v/ v)
Ce mélange est miscible.

solvant B : isopropanol - eau (6 : 3, v/ v). Ce mélange est ajusté à pH 8 par addition d'une faible quantité d'ammoniaque

solvant C : n-butanol - acide phosphorique - eau (3 : 1 : 3 , v/ v/ v). Ce système est composé de deux phases. La phase supérieure est utilisée comme solvant.

Le tampon de phosphates $5.10^{-2}M$ pH 7,4 a également été utilisé comme solvant.

3°) développement des chromatogrammes.-

Nous avons appliqué la technique ascendante.

4°) révélation des chromatogrammes.-

Exposition des plaques aux vapeurs ammoniacales : l'ammoniaque accentue les colorations du PLP et de ses dérivés ainsi que leurs fluorescences en lumière ultra-violette.

Réactif de Gibbs (IOI) : ce réactif permet de décélérer, après chromatographie, 0,1 μg de PLP.

Solution de vanilline à 2 p. 100 dans l'alcool éthylique : la vanilline forme avec les hydrazides des hydrazones colorées en jaune.

5°) cas des chromatogrammes radioactifs.-

La radioactivité des chromatogrammes réalisés avec des composés marqués au ^{14}C a été mesurée à l'aide d'un enregistreur Berthold.

Chromatographie en couches minces de gel de sephadex G-100.

Il s'agit en fait d'une filtration analogue à celle réalisée sur colonne. Nous avons suivi la technique décrite par Morris (100).

Nous avons utilisé du tampon tris 5.10^{-2}M pH 7. La filtration étant terminée, les protéines ont été révélées par coloration à l'amidoschwartz :

<i>colorant</i> :	amidoschwartz	0,50 g
	méthanol	40 ml
	eau	50 ml
	acide acétique	10 ml

L'excès de colorant a été éliminé par lavages avec la solution suivante :

méthanol	350 ml
eau	500 ml
acide acétique	70 ml
diacétone alcool	80 ml

Cette méthode nous a permis de déterminer les limites entre lesquelles s'échelonnent les poids moléculaires des protéines de la préparation de DOPA décarboxylase (étape III). Les protéines de référence étaient :

	albumine bovine
	α -chymotrypsine
	cytochrome c

Electrophorèse.-

Nous avons effectué des électrophorèses de protéines sur gel d'acétate de cellulose. Nous avons utilisé les bandes de cellogel fabriquées par la Société Chemetron Chimica. La migration était réalisée dans les conditions suivantes :

pH : 7,4 (milieu tampon de phosphates $5.10^{-2}M$)

tension : 145 V

température : entre 0 et 5°C

durée de la migration : 3 h.

Les protéines étaient révélées, après migration, par coloration à l'amidoschwartz.

Dosage de l'isonicotylhydrazide (INH).-

Méthode à la vanilline - L'INH réagit avec la vanilline pour former une hydrazone colorée en jaune (26). Nous avons enregistré le spectre d'absorption de l'hydrazone : il présente un maximum d'absorption situé à 355 nm.

Mode opératoire

0,2 ml de solution de vanilline à 2 p. 100 dans l'alcool éthylique à 90° GL est ajouté à 1 ml de solution d'INH à doser. Après 45 mn de contact la densité optique du milieu est mesurée à 355 nm.

Méthode à l'o-phénanthroline - Fe^{+++} - L'INH possède des propriétés réductrices : il réduit le Fe^{+++} en Fe^{++} . Les ions ferreux donnent avec l'o-phénanthroline un complexe rouge qui absorbe à 510 nm (130).

Mode opératoire

à 1 ml de solution d'INH à doser sont ajoutés : 0,2 ml de solution de Cl_3Fe à 0,4 p. 100 et 0,2 ml de solution d'o-phénanthroline à 0,5 p. 100. Les réactifs sont préparés extemporanément avec du tampon tris $5.10^{-2}M$ pH 7,4. L'absorption à 510 nm est mesurée après 60 mn de contact.

Cette méthode est très sensible, elle permet de mesurer des concentrations d'INH de l'ordre de 1 à $2 \cdot 10^{-6}$ M/l. Mais elle n'est pas utilisable en présence d'ions phosphates : il se forme un précipité de phosphate ferreux

Méthode spectrophotométrique directe - Le spectre d'absorption de l'INH présente un maximum à 260 nm (63). En l'absence d'autres substances absorbant dans l'ultra-violet, la concentration de l'INH dans un milieu peut être déterminée en mesurant la densité optique du milieu à 260 nm.

La figure 2 représente la variation de la densité optique à 355 nm (méthode à la vanilline) - à 510 nm (méthode à l'o-phénanthroline) à 260 nm (méthode spectrophotométrique directe) en fonction de la quantité d'INH.

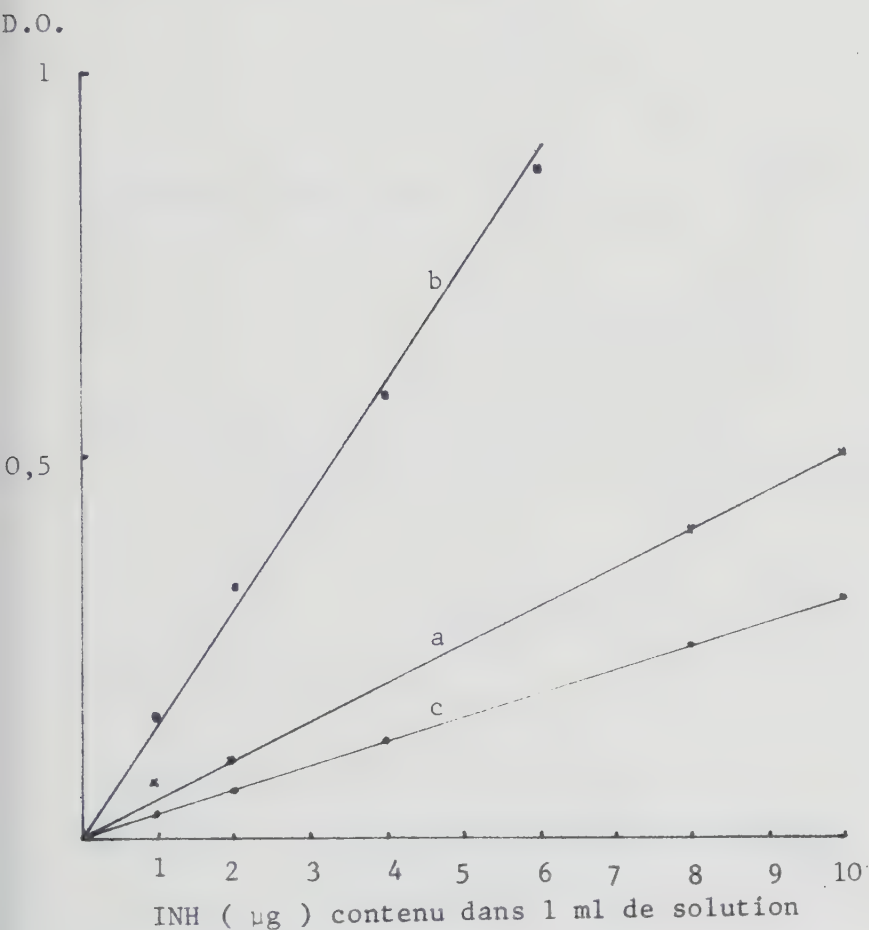


Fig. 2.- Dosage de l'INH.

Méthode à la vanilline : D.O. λ 355 nm (a)

Méthode à l'o-phénanthroline- Fe^{+++} : D.O. λ 510 nm (b)

Méthode spectrophotométrique directe : D.O. λ 260 nm (c)

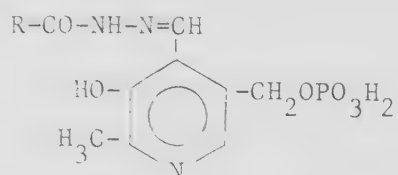
Chapitre II

PREPARATION ET CARACTERES DES DERIVES

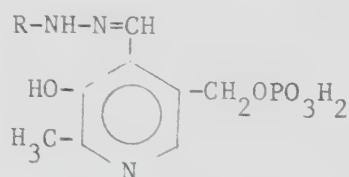
DU PHOSPHO-5 PYRIDOXAL

Nous avons préparé et étudié :

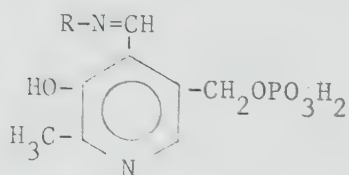
- 7 hydrazones d'hydrazides ou *hydrazidones*, formule générale :



- 4 hydrazones d'hydrazines ou *hydrazinones*, formule générale :



- 2 *imines* ou base de Schiff et *l'oxime*, formule générale :



Les dérivés du PLP sont préparés selon la technique que nous décrivons en détail pour l'INHPLP sauf certains dont la préparation particulière est indiquée.

Les rendements des préparations sont compris entre 70 et 90 p. 100, à l'exception de ceux de la cyanacétylhydrazone et de la N-méthylbenzylhydrazone de PLP (50 et 55 p. 100).

Tous les dérivés se présentent sous forme de poudres microcristallines solubles dans le tampon de phosphates $5.10^{-2}M$ pH 7,4.

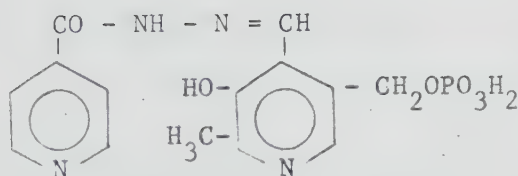
La plupart des dérivés noircissent et se décomposent quand la température dépasse $200^{\circ}C$.

La chromatographie en couche mince de certaines hydrazones de PLP montrent qu'elles renferment moins de 1 p. 100 de PLP non combiné. Les Rf de ces dérivés sont rassemblés dans le tableau 1.

Les caractéristiques des spectres d'absorption des dérivés du PLP sont données dans le tableau 2 . Les hydrazidones possèdent en général deux bandes d'absorption : l'une, étroite, est centrée à 285 ou à 295 nm, l'autre, plus large, est située vers 330-340 nm.

a) HYDRAZIDONES DE PLP

- Isonicotylhydrazone de phospho-5 pyridoxal (INHPLP) -



Préparation.-

24,7 mg (0,1 millimole) de PLP (Hoffmann-La Roche) sont dissous dans 5,1 ml d'eau bi-distillée au B.M. à 60°C. On ajoute, après dissolution, 5,2 ml d'alcool éthylique à 96°GL. On introduit ensuite, goutte à goutte en agitant, 13,7 mg (0,1 millimole) d'INH (Hoffmann-La Roche) dans 2 ml d'alcool éthylique à 50°GL. Un précipité orange apparaît après quelques secondes. Le mélange est porté à 60°C au reflux pendant 1 h. Le précipité est recueilli par centrifugation puis remis en suspension dans 5 ml d'alcool éthylique à 50°GL et à nouveau centrifugé. Le liquide surnageant est éliminé et l'opération est répétée 9 fois. Après un dernier lavage avec 5 ml d'éther, le produit est séché sous vide dans un dessiccateur contenant de la paraffine.

Quantité obtenue : 31,46 mg (Rdt : 86 p. 100).

L'INHPLP noircit à 265°C.

Spectre d'absorption à différents pH.-

Le spectre de l'INHPLP varie en fonction du pH (63). Bonavita et Scardi ont étudié cette variation et ont calculé les pK des divers groupes ionisables portés par la molécule (21). Ils ont constaté que l'ionisation de l'INHPLP était analogue à celle du PLP. Ils ont suggéré que l'INHPLP, comme le PLP (72) existe sous deux formes : une forme incolore que l'on rencontre en milieu acide et une forme quinoïde jaune que l'on obtient par alcalinisation du milieu.

Nous avons enregistré le spectre de l'INHPLP en solution dans du tampon de phosphates 5.10^{-2} M, à différents pH allant de 7,56 à 10,4 (fig. 3). Nous avons observé que le maximum d'absorption à 295 nm diminue quand le pH augmente et qu'il se déplace vers 310 nm. En même temps, l'absorption dans la région comprise entre 400 et 450 nm augmente.

Stabilité de l'INHPLP en milieu acide et en milieu alcalin.-

Nous avons chromatographié l'INHPLP après un séjour de 20 heures d'une part à pH 1 (milieu contenant de l'acide phosphorique) et d'autre part à pH 10 (milieu contenant de l'ammoniaque). Les chromatographies (CCM)

ont été réalisées à l'aide du solvant A.

Nous avons observé la présence de PLP ($R_f = 0,38-0,40$) sur les chromatogrammes obtenus à partir d'INHPLP ($R_f = 0,30-0,33$) maintenue à pH 10. L'INHPLP incubée à pH 1 ne renfermait pas de PLP.

Nous en avons déduit que l'hydrazone est instable en milieu alcalin et stable en milieu acide.

Solubilité.-

Nous avons étudié la solubilité de l'INHPLP dans l'eau distillée (pH 5,5), dans une solution de chlorure de sodium $5.10^{-2}M$ (pH 5,8) et dans du tampon de phosphates $5.10^{-2}M$ pH 7,3.

Nous avons opéré de la façon suivante : nous avons préparé une solution de PLP $2.10^{-3}M$ et une solution d'INH $2.10^{-3}M$ dans le solvant choisi et nous les avons mélangées, volume à volume. Nous avons ensuite observé les milieux.

Voici les résultats obtenus dans ces conditions :

- Après addition de la solution d'INH dans le tampon de phosphates à la solution de PLP dans le même tampon, le milieu se colore en jaune orangé intense caractéristique de l'INHPLP en solution. Il n'apparaît pas de précipité.

- Après mélange des solutions d'INH et de PLP dans l'eau distillée ou dans la solution de chlorure de sodium, un précipité orange apparaît plus ou moins rapidement. Le pH du liquide surnageant est égal à 4,8.

Ainsi l'INHPLP est insoluble sans l'eau et dans une solution de chlorure de sodium, sel dont la présence a peu d'influence sur le pH du milieu. Par contre, les phosphates de sodium et de potassium qui modifient le pH du milieu rendent l'INHPLP soluble.

La solubilité de l'hydrazone est donc fonction du pH du milieu et, d'après les essais que nous avons effectués, elle passe par un minimum qui se situe aux environs de pH 4-5.

Nous pensons que cette zone d'insolubilité correspond à la neutralité électrique de la molécule d'hydrazone.

Action du borohydrure de sodium sur l'INHPLP.-

Le borohydrure de sodium (BH_4Na) a la propriété de réduire les doubles liaisons. Ainsi la liaison $-\text{CH}=\text{N}-$ qui existe entre le PLP et une enzyme (76) devient sous l'action du BH_4Na $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ce qui a pour effet de fixer irréversiblement le PLP à la protéine. Nous avons utilisé le BH_4Na pour étudier le comportement de l'INHPLP en présence d'enzyme, aussi il était nécessaire de connaître son action sur l'hydrazone elle-même.

Nous avons employé du BH_4Na anhydre. L'INHPLP était mise en solution 2.10^{-4}M dans du tampon de phosphates 5.10^{-2}M pH 7,4. Le BH_4Na était ajouté à la solution d'hydrazone à raison de 0,2 mg par ml (faible concentration) ou de 1 à 2 mg par ml (forte concentration). Le dégagement gazeux ayant cessé, le spectre de la solution était enregistré après dilution.

Nous avons constaté qu'à faible concentration le BH_4Na ne modifie pas le spectre de l'INHPLP. Par contre, à forte concentration il produit une décoloration de la solution d'hydrazone qui présente alors un spectre très modifié. Le nouveau spectre, stable après 30 mn, possède une bande d'absorption allant de 320 à 330 nm (fig.4). Cette bande est due à la présence d'une liaison $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ en 4 du reste phosphopyridoxalique. En effet, la phospho-5 pyridoxamine possède un maximum d'absorption à 326,5 nm (106).

Ce résultat est analogue à ceux obtenus par Tapia et Awapara avec des hydrazones de PLP réduites (124) et par Séverin et coll. avec des imines de PLP réduites (118).

Isonicotylhydrazone ($^{14}\text{C}-2$) de phospho-5 pyridoxal.-

Isonicotylhydrazide ($^{14}\text{C}-2$) :

a été préparé par le C.E.A.

Activité spécifique : 5 millicuries par millimole.

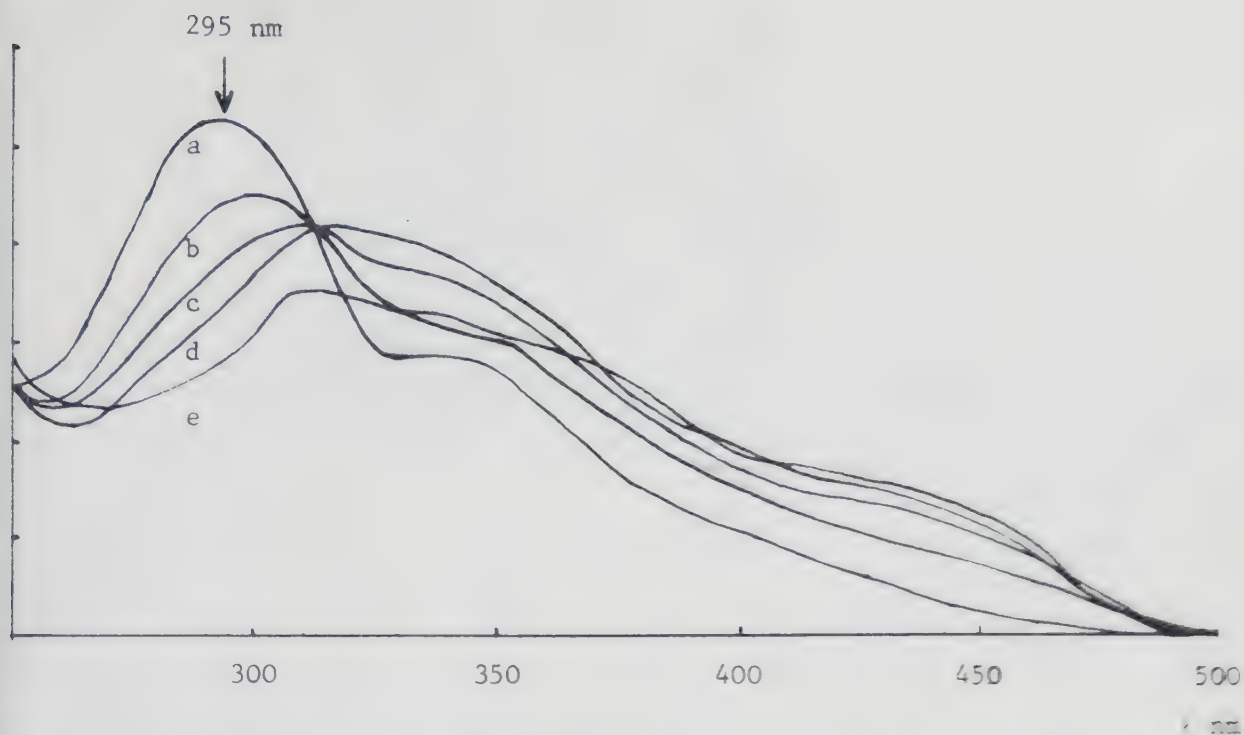


Fig. 3.- Spectre d'absorption de l'INHPLP à différents pH.

L'INHPLP est en solution $3,27 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ dans du tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ pH: 7,56 (a), 8,3 (b), 8,76 (c), 9,32 (d), 10,4 (e).

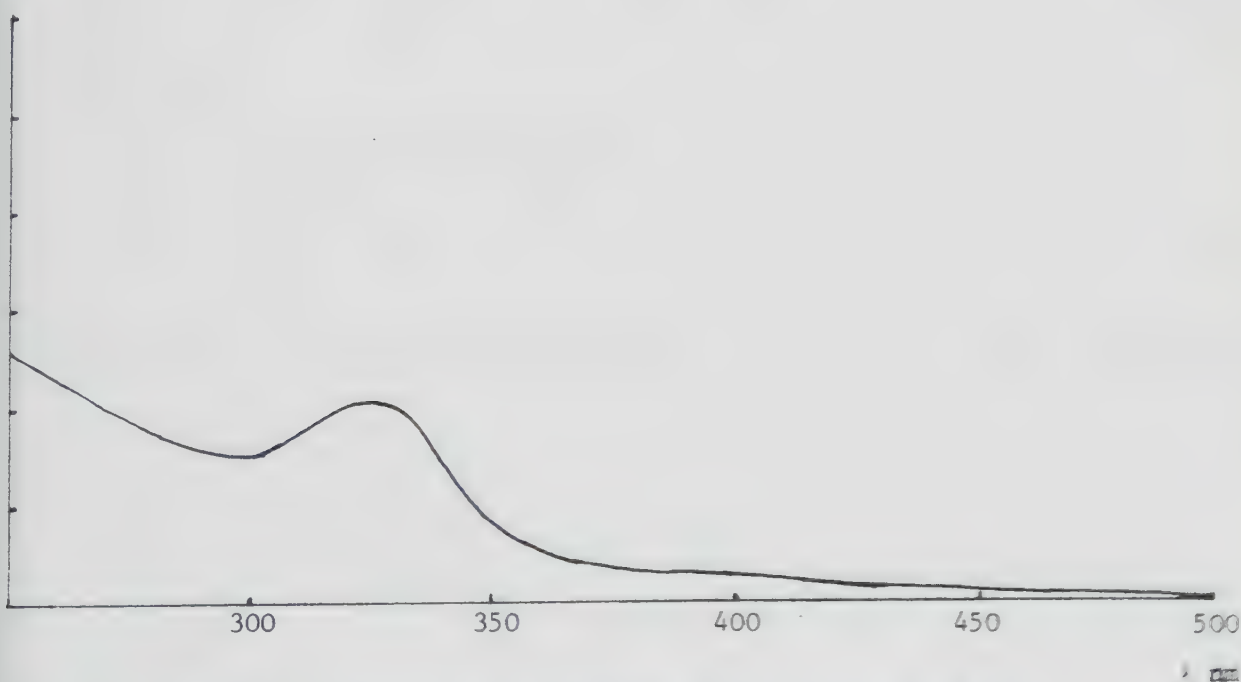


Fig. 4.- Spectre d'absorption de l'INHPLP après action du BH_4Na à forte concentration.

INHPLP $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ - pH du milieu : 7,4

Préparation.-

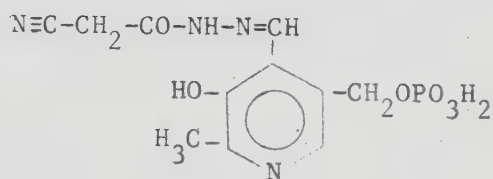
4,94 mg (0,02 millimole) de PLP (Hoffmann-La Roche) sont dissous dans 1,1 ml d'eau distillée au B.M. à 60°C. On ajoute, après dissolution, 1,2 ml d'alcool éthylique à 96°GL. On introduit ensuite goutte à goutte en agitant 2,74 mg (0,02 millimole) d'isonicotylhydrazide (^{14}C -2) dans 2 ml d'alcool éthylique à 50°GL. Un précipité orange apparaît lentement. On laisse reposer 24 h. puis on procède aux lavages comme il a été indiqué pour l'INHPLP (volume d'alcool éthylique à 50°GL utilisé par lavage : 1 ml).

Quantité obtenue : 4,55 mg (Rdt = 62 %).

Spectre d'absorption.-

L'isonicotylhydrazone de PLP (^{14}C -2) est mise en solution dans du tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ pH 7,4. Son spectre est identique à celui de l'INHPLP non marquée.

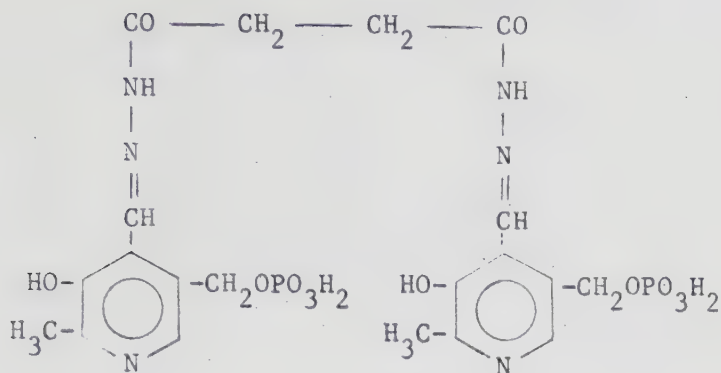
Cyanacétylhydrazone de phospho-5 pyridoxal.-



P.M. = 328

cyanacétylhydrazide : fourni par les laboratoires Schuchardt.

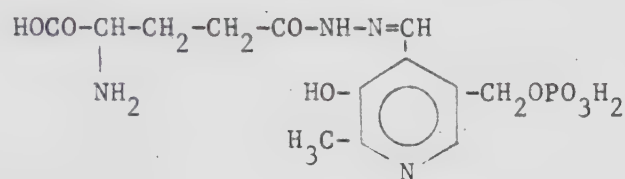
Succinylhydrazone de phospho-5 pyridoxal.-



P.M. = 604

dihydrazide succinique : fourni par les laboratoires Upjohn.

γ-glutamylhydrazone de phospho-5 pyridoxal.-

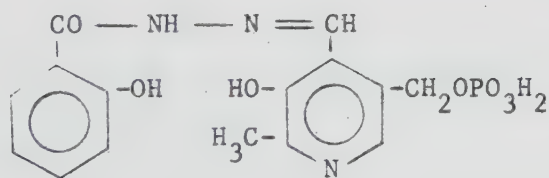


P.M. = 390

γ-glutamylhydrazide : fourni par Nutritional Biochemicals Corporation.

Le spectre que nous avons obtenu est analogue à celui décrit par Tapia et coll. (126).

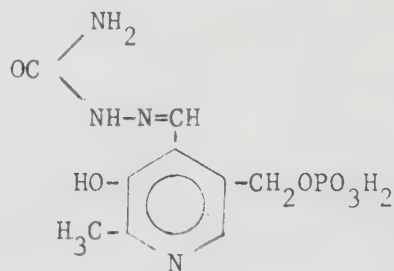
Salicylhydrazone de phospho-5 pyridoxal.-



P.M. = 381

Salicylhydrazide : fourni par les laboratoires Upjohn.

Semicarbazone de phospho-5 pyridoxal.-

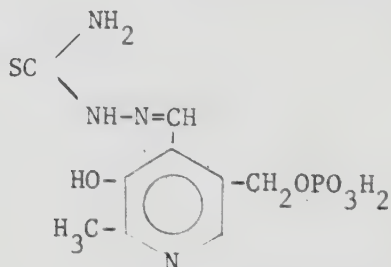


P.M. = 304

chlorhydrate de semicarbazide : fourni par les laboratoires Rhône-Poulenc

Le spectre que nous avons obtenu présente un maximum d'absorption à 285 nm, comme l'a indiqué R.G. Wiegand (134).

Thiosemicarbazone de phospho-5 pyridoxal.-



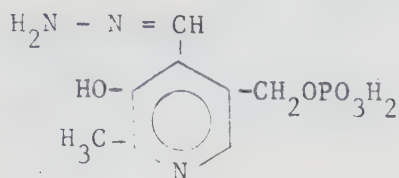
P.M. = 320

thiosemicarbazide : fourni par les laboratoires Merck.

Le spectre que nous avons obtenu est analogue à celui décrit par R.G. Wiegand (134).

b) HYDRAZINONES DE PLP

Hydrazone de phospho-5 pyridoxal.-



P.M. = 261

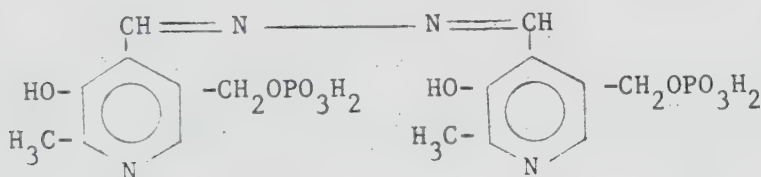
Préparation

L'hydrazone de PLP a été préparée selon la méthode indiquée par Curry et Bulen (35).

hydrate d'hydrazine : fourni par les laboratoires Merck.

Le spectre que nous avons obtenu est identique à celui décrit par Curry et Bulen (35).

Azine de phospho-5 pyridoxal.-



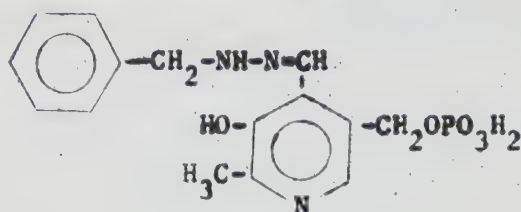
P.M. = 490

Préparation

L'azine de PLP a été préparée selon la méthode indiquée par Curry et Bulen (35).

Le spectre que nous avons obtenu est identique à celui décrit par Curry et Bulen et présente les mêmes variations en fonction du temps (35).

Benzylhydrazone de phospho-5 pyridoxal.-



P.M. = 351

chlorhydrate de benzylhydrazine : fourni par les laboratoires Hoffmann - La Roche.

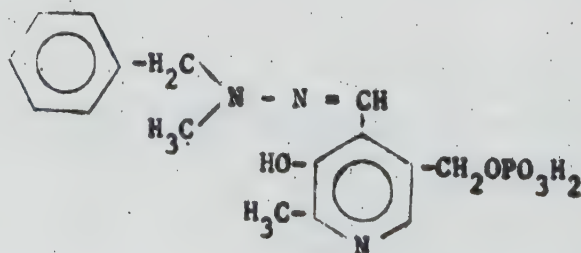
Action du BH_4Na

Nous avons étudié l'action du BH_4Na sur la benzylhydrazone de PLP pour les mêmes raisons que celles qui ont été indiquées à propos de l'INHPLP.

Nous avons fait agir le BH_4Na (0,2 mg par ml de solution) sur la benzylhydrazone de PLP en solution 2.10^{-4}M dans du tampon de phosphates 5.10^{-2}M pH 7,4. Le dégagement gazeux ayant cessé, nous avons enregistré le spectre de la solution préalablement diluée au 1/10ème.

Nous avons constaté qu'à cette concentration le BH_4Na est sans action sur la benzylhydrazone de PLP.

N-méthylbenzylhydrazone de phospho-5 pyridoxal.-

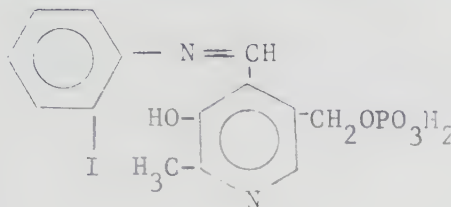


P.M. = 365

phosphate de N-méthylbenzylhydrazine : fourni par les laboratoires Hoffmann - La Roche.

c) IMINES ET OXIME DE PLP

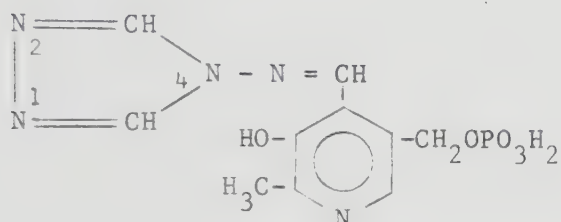
Iodo-2 phényl imine de phospho-5 pyridoxal.-



P.M. = 448

o-iodaniline ou iodo-2 aniline : fournie par les laboratoires Aldrick.

Triazolyl imine de phospho-5 pyridoxal.-



P.M. = 313

Préparation

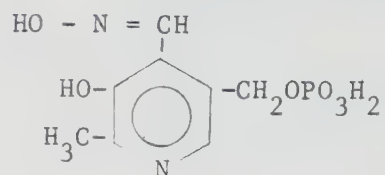
L'imine a été préparée selon la technique décrite par P. Gonnard et coll. (57).

Amino-4 triazole-1, 2, 4 : ce composé a été préparé par Monsieur Pesson qui a bien voulu le mettre à notre disposition.

Instabilité de l'imine en milieu acide

Nous avons mis en évidence l'instabilité de l'imine en milieu acide par chromatographie en couche mince sur gel de silice à l'aide du solvant C. Ce solvant étant lui-même acide, il provoque la décomposition de l'imine au cours du développement chromatographique mais la quantité de PLP décelée est d'autant plus importante que l'imine a été préalablement maintenue plus longtemps à pH 1 (milieu contenant de l'acide phosphorique). L'imine est donc instable en milieu acide.

Oxime de phospho-5 pyridoxal.-



P.M. = 262

chlorhydrate d'hydroxylamine : fourni par les laboratoires Rhône-Poulenc.

Chromatographie en couche mince

Composé	Solvant	Rf	Examen U. V. après vap. NH ₃ Fluorescence	Examen après réactif de Gibbs Coloration
PLP	A	0,35 — 0,42	jaune	bleue
	B	0,25 — 0,45	jaune	bleue
	C	0,67	jaune	bleue
INHPLP	C	0,10	jaune	bleue
cyanacétylhydrazone de PLP	A	0,24		jaune
semicarbazone de PLP	C	0,21	jaune orangé	
thiosemicarbazone de PLP	C	0,55	bleu vert	
hydrazone de PLP	C	0,25	orange	
benzylhydrazone de PLP	B	0,70	jaune ocre	
N-méthylbenzylhydrazone de PLP	B	0,75	jaune ocre	
triazolyl imine de PLP	C	0,19	verte	

support : silice G - *solvant A* : n-butanol - acide acétique - eau (6 : 2 : 2 , v/ v/ v) -

solvant B : isopropanol - eau (6 : 3, v/ v), ce mélange est ajusté à pH 8 par addition

d'ammoniaque - *solvant C* : n-butanol - acide phosphorique - eau (3 : 1 : 3, v/ v/ v) la phase

supérieure de ce système est utilisée comme solvant - *technique* : voir chapitre I -

Caractères spectraux des dérivés du PLP

composé	couleur du composé	conc.	spectre d'absorption		
			λ_M	ϵ_M	
INHPLP	orange	$3,27 \cdot 10^{-5}$	295 325 $\rightarrow$ 345	15.800 8.600	
cyanacétylhydrazone de PLP	jaune ocre	$5 \cdot 10^{-5}$	285 325 $\rightarrow$ 335	12.000 6.000	
succinylhydrazone de PLP	jaune clair	$1,66 \cdot 10^{-5}$	285 325 $\rightarrow$ 340	33.700 12.600	
γ -glutamylhydrazone de PLP	jaune clair	$5 \cdot 10^{-5}$	285 330 $\rightarrow$ 345	16.600 6.400	
salicylhydrazone de PLP	jaune citron	$5 \cdot 10^{-5}$	295 345	16.600 11.200	
semicarbazone de PLP	beige rosé	$5 \cdot 10^{-5}$	285 350 $\rightarrow$ 370	12.600 6.600	
thiosemicarbazone de PLP	jaune	$5 \cdot 10^{-5}$	310 380	13.400 12.000	
hydrazone de PLP	chamois	$5 \cdot 10^{-5}$	282 323	10.000 7.000	
azine de PLP (*)	jaune	$5 \cdot 10^{-5}$	285 320 380		
benzylhydrazone de PLP	jaune citron	$3 \cdot 10^{-5}$	303 327	14.000 12.600	
N-méthylbenzylhydrazone de PLP	jaune pâle	$5 \cdot 10^{-5}$	313 335 375	12.600 14.100 6.300	

Tableau 2. (suite)

iodo-2 phényl imine de PLP	jaune orangé			
triazolyl imine de PLP	jaune clair	5.10^{-5}	238 280 385	17.400 7.800 7.800
oxime de PLP	beige rosé	1.10^{-4}	330	4.800

Le composé est mis en solution dans du tampon de phosphates $5.10^{-2}M$ pH 7,4.

Le spectre est enregistré immédiatement - *conc* : concentration du composé exprimée en molécule par litre - λ_M : désigne la ou les longueurs d'onde en mμ correspondant à un maximum ou à une bande d'absorption - ϵ_M : coefficient d'extinction moléculaire -

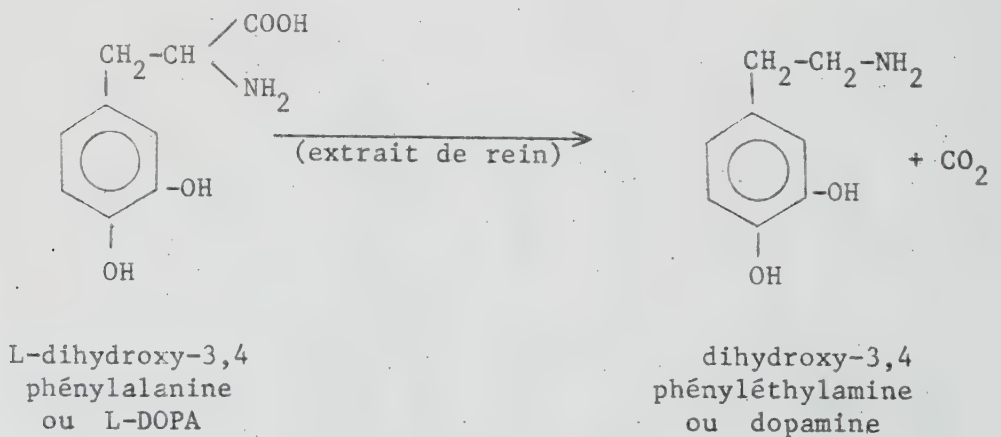
(*) - Le spectre de l'azine de PLP évoluant en fonction du temps, les ϵ_M ne sont pas donnés.

Chapitre III

DOPA DECARBOXYLASE

DOSAGE ET PREPARATION

En 1938, Holtz et Heise constatent que la L-DOPA, en présence d'extraits de reins de différentes espèces animales, se transforme en une substance douée de propriétés hypertensives. Ils isolent le composé formé et l'identifient. Il s'agit du produit de décarboxylation de la L-DOPA : la dopamine. Ils attribuent cette réaction à la présence dans les extraits de reins d'une enzyme : la DOPA décarboxylase (75)



Ensuite, cette enzyme a été retrouvée dans le rein, le foie et le pancréas de différentes espèces animales (12, 74) ainsi que dans le rein de l'homme (12). Puis, il a été possible de la caractériser en quantité beaucoup plus faible dans la médullo surrénale (88, 44).*

Tandis que la "codécarboxylase" de Gale était identifiée au PLP (46), plusieurs auteurs ont montré que le PLP constitue également le coenzyme de la DOPA décarboxylase (67, 107, 14, 49). Le spectre d'absorption de la DOPA décarboxylase présente un maximum à 415 nm (7), caractéristique des pyridoxaloenzymes.

La DOPA décarboxylase est localisée dans le cytoplasme (15, 105).

La catalyse exercée par la DOPA décarboxylase n'est pas limitée à la seule décarboxylation de la DOPA. Les isomères de la DOPA, des acides aminés tels que l'o-tyrosine et la m-tyrosine, qui portent un hydroxyle en position 2 ou 3 sur le noyau phényle, sont également décarboxylés (13, 36, 69). De même la dihydroxy-3,4 phénylsérine est substrat de la DOPA décarboxylase (133) par contre la p-tyrosine, qui est dépourvue d'hydroxyle en position 2 et 3, n'est pas décarboxylée (16, 17).

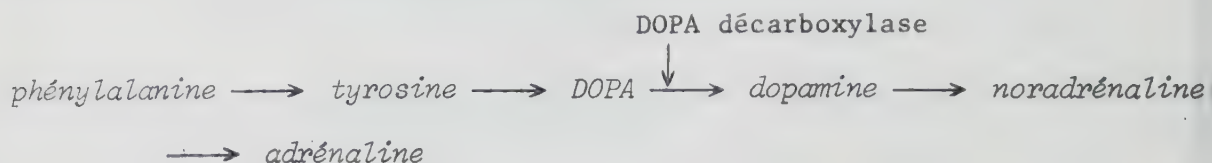
Il semble maintenant admis que la DOPA décarboxylase catalyse aussi la décarboxylation de l'hydroxy-5 tryptophane en hydroxy-5 tryptamine ou sérotonine (117, 112, 44, 137, 138).

Certains auteurs considèrent même qu'il existe une seule décarboxylase active sur tous les acides aminés aromatiques, parmi lesquels ils incluent des acides aminés hétérocycliques (histidine et dérivés) (90).

* Il ne sera question ici que de l'enzyme d'origine animale.

Cette hypothèse ne paraît pas devoir être retenue (53).

La DOPA décarboxylase occupe une place importante dans le métabolisme des catécholamines. Dès 1939, Blaschko proposa la séquence suivante pour la biosynthèse de l'adrénaline (11) :



La conversion de la DOPA en noradrénaline fut effectivement démontrée plus tard à l'aide de DOPA marquée au ^{14}C (40).

MESURE DE L'ACTIVITE DE LA DOPA DECARBOXYLASE

La DOPA décarboxylase, comme nous venons de le voir, est une enzyme intéressante tant au point de vue biochimique que physiologique, aussi a-t-on cherché à mesurer son activité dans les conditions les plus favorables. Les méthodes de mesure sont nombreuses. Nous les classerons en deux groupes. Dans le premier groupe nous réunirons toutes les méthodes fondées sur le dosage de l'anhydride carbonique : méthode manométrique, méthodes utilisant un substrat marqué au ^{14}C libérant sous l'action de l'enzyme du $^{14}\text{CO}_2$ et méthode automatique. Le deuxième groupe comprendra les méthodes fondées sur le dosage de la dopamine.

Nous examinerons successivement ces différentes méthodes et nous décrirons la technique manométrique que nous avons utilisée ainsi que la technique automatique que nous avons mise au point.

1^{er} Groupe : Dosage du CO₂

Méthode manométrique.-

Le CO₂ formé au cours de la décarboxylation enzymatique de la DOPA peut être déterminé à l'aide de l'appareil de Warburg. Cet appareil, conçu pour étudier les échanges respiratoires, permet de mesurer une variation de pression due à une absorption ou à une élimination de gaz qui se produit à température constante et à volume constant. De la variation de pression on déduit le volume de gaz échangé (128).

C'est avec cet appareil qu'Holtz et Heise (75) mesurèrent pour la première fois l'activité décarboxylasique de l'enzyme qu'ils venaient de mettre en évidence dans des extraits de reins : la DOPA décarboxylase. La méthode manométrique resta ensuite pendant une quinzaine d'années la seule méthode de mesure de la DOPA décarboxylase, en dehors des méthodes physiologiques. Elle fut utilisée pour doser non seulement l'activité de la DOPA décarboxylase (12, 114, 44, 133) mais aussi celle de la 5-HTP décarboxylase (32, 137), de la tyrosine décarboxylase (68) et de la glutamate décarboxylase (91, 39) entre autres.

Cette méthode, si largement répandue, présente cependant quelques inconvénients. Elle est peu sensible et nécessite des manipulations longues et délicates, ce qui est particulièrement gênant lorsque l'on doit effectuer des mesures d'activité en fonction du temps de réaction. En effet, si le milieu de réaction est une solution saline ayant un pH voisin ou supérieur à 7, ce qui est le cas pour la DOPA décarboxylase, le CO₂ reste en partie dissous sous forme de bicarbonates. Pour provoquer le dégagement gazeux de la totalité du CO₂ formé il faut acidifier le milieu ce qui a pour autre conséquence d'arrêter la réaction enzymatique. On doit, par conséquent, préparer autant d'essais qu'il y a de mesures à faire.

Pour remédier à cet inconvénient, on peut suivre la technique préconisée par Blaschko (12). On note, en fonction du temps de réaction, le dégagement partiel de CO₂ et l'on construit la courbe correspondante.

A la fin de la réaction on mesure d'abord le dégagement partiel de CO_2 puis après acidification le dégagement total. Connaissant le rapport $\frac{\text{CO}_2 \text{ total}}{\text{CO}_2 \text{ partiel}}$ on trace, à partir de la première courbe, celle qui représente le CO_2 total formé en fonction du temps. Une condition est nécessaire pour que cette méthode soit valable : le rapport $\frac{\text{CO}_2 \text{ total}}{\text{CO}_2 \text{ partiel}}$ ne doit pas varier au cours de la réaction, c'est-à-dire que le pH du milieu doit être constant.

On peut aussi calculer la quantité totale de CO_2 formé en tenant compte de la solubilité du gaz au pH auquel on a opéré la mesure. On trouve dans "Manometric techniques" un graphique établi d'après la formule de M.J. Johnson qui donne la solubilité du CO_2 en fonction du pH à différentes températures (128). Cette méthode, comme la précédente, ne peut être appliquée que si le pH du milieu est constant au cours de la réaction et inférieur à 7, au dessus de cette valeur la rétention du CO_2 est trop élevée pour que la méthode soit valable.

Nous avons essayé d'utiliser ces deux procédés pour réaliser des mesures cinétiques en présence de DOPA décarboxylase en milieu tampon de phosphates pH 7. Dans les deux cas les essais que nous avons effectués nous ont malheureusement donné des résultats inférieurs à ceux obtenus en mesurant le CO_2 dégagé en milieu acide. Nous avons donc toujours acidifié le milieu avant de faire une lecture.

Mode opératoire

Nous utilisons des flacons à deux appendices latéraux. L'un des appendices est fermé par un bouchon rodé, l'autre par une cheminée qui permet le passage d'un courant gazeux dans le flacon avant la mise en route de la réaction.

Nous introduisons dans l'espace principal :

la préparation enzymatique

la solution de coenzyme : PLP ou dérivé du PLP

la solution de tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4

Dans l'un des appendices nous versions :

la solution de substrat : 0,5 ml de L-DOPA $1,6 \cdot 10^{-2} M$
ou $2 \cdot 10^{-2} M$, soit 8 ou 10 μ moles par flacon.

Dans l'autre appendice nous plaçons :

la solution d'acide : 0,5 ml SO_4H_2 3,6 N.

Le milieu de réaction a un volume égal à 2,5 ml et le volume total du liquide contenu dans le flacon est de 3 ml. La température du milieu est égale à 37°C.

Tous les réactifs sont préparés au moment du dosage avec une solution de tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2} M$ pH 7,4 préalablement privée de CO_2 par ébullition.

Dans chaque série de dosage on effectue un blanc réactif en remplaçant la solution de L-DOPA par du tampon.

La réaction enzymatique est réalisée en atmosphère inerte pour éviter les réactions secondaires dues à l'amine oxydase présente dans les préparations enzymatiques non purifiées. Nous faisons passer dans les flacons pendant 10 mn, avant la réaction enzymatique, un courant d'azote R.

Le temps de réaction est compris entre le moment où nous versions la solution de substrat dans l'espace principal et celui où l'acide sulfurique est ajouté au milieu. Nous ne décrivons pas la manipulation elle-même. Nous avons suivi la technique indiquée dans " Manometric techniques " (128).

Résultats

Chaque résultat est la moyenne de trois mesures.

Les résultats sont exprimés en μ moles de CO_2 dégagé à 37°C pendant le temps de réaction.

Le temps de réaction et le volume de préparation enzymatique utilisé doivent être choisis de telle manière que le substrat reste en excès jusqu'à la fin de la réaction. Or, d'une part la solubilité de la L-DOPA est faible, même en milieu légèrement alcalin, et d'autre part le volume de solution de L-DOPA que l'on peut placer à l'intérieur de l'appendice latéral du flacon de Warburg est limité à 0,5 ml. Pour ces raisons la quantité de substrat présente dans chaque milieu de réaction ne dépasse pas 10 μ moles.

On voit sur la figure 5 que la vitesse de réaction diminue à partir du moment où la quantité de CO_2 dégagé est supérieure à 5 μ moles. c'est à dire quand plus de la moitié du substrat est transformé.

Remarque - Si l'on introduisait la solution de substrat dans l'espace principal au moment de la distribution des réactifs on réaliserait obligatoirement l'un des deux mélanges suivants :

- a) substrat + enzyme
- b) " + PLP

Dans le cas a), il serait impossible de déterminer le temps zéro de la réaction et dans le cas b) le PLP réagirait avec la DOPA pour former un composé tetrahydroisoquinoline inhibiteur de la DOPA décarboxylase (11).

La figure 6 montre que la quantité de CO_2 dégagé est proportionnelle au volume de préparation enzymatique dans les conditions indiquées ci-dessus et pour un temps de réaction de 10 mn.

Sensibilité - Il est possible de mesurer une activité enzymatique correspondant à un dégagement de CO_2 égal à 0,5 μ mole.

Précision - Dans la colonne a du tableau 3 nous avons réuni les résultats de 9 déterminations effectuées avec la même préparation enzymatique. Ces données seront comparées à celles fournies par la méthode automatique.

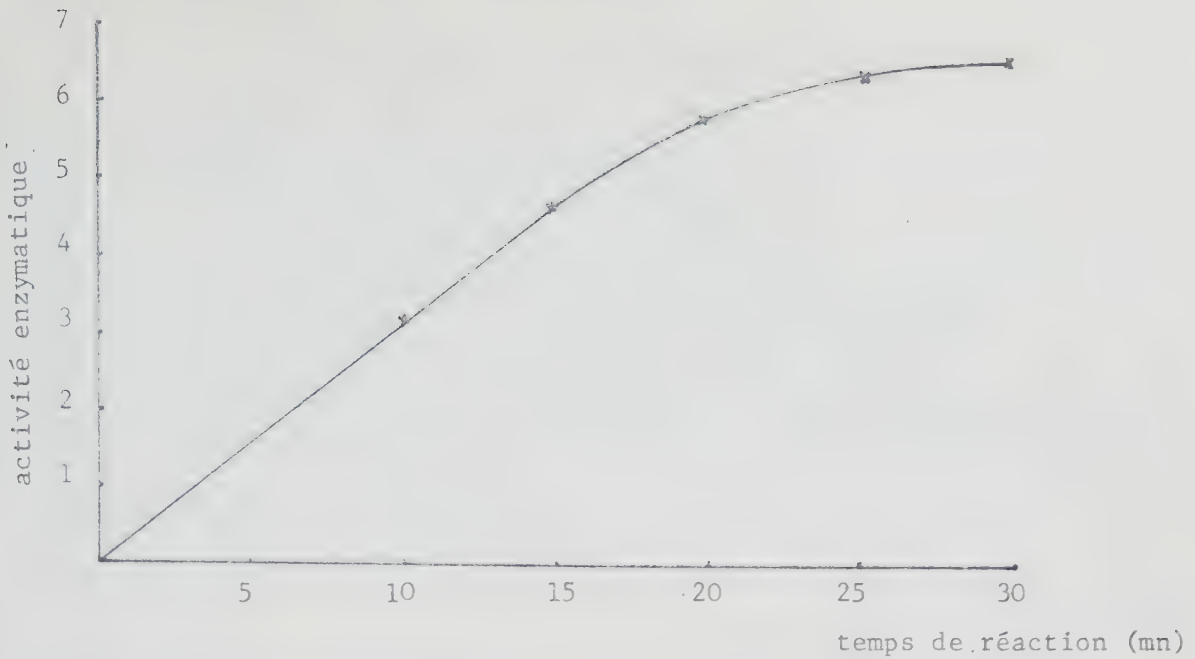


Fig. 5.- Dosage manométrique de la DOPA décarboxylase -
Activité enzymatique en fonction du temps de réaction.

- La préparation enzymatique est obtenue à partir de reins de lapin, elle correspond à l'étape I de la purification
- L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé à 37°C à pH 7,4, en présence de PLP 8.10^{-5}M , de L-DOPA $3,2.10^{-3}\text{M}$ et d'un volume de préparation enzymatique égal à 0,4 ml.

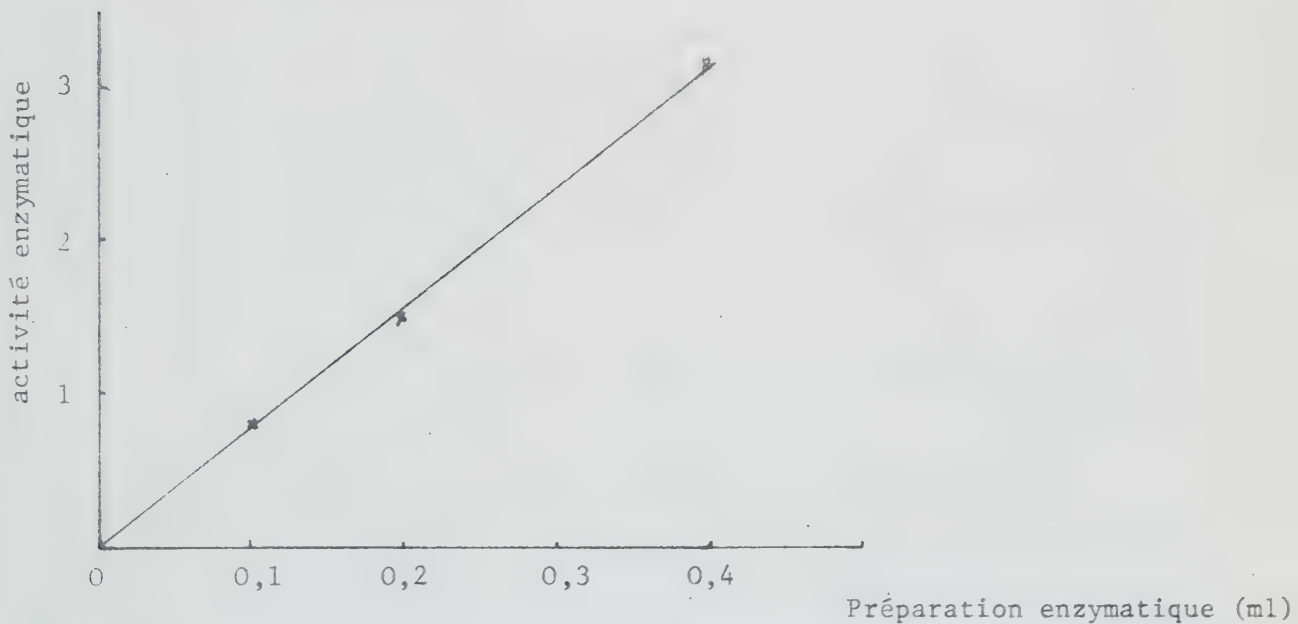


Fig. 6.- Dosage manométrique de la DOPA décarboxylase -
Activité enzymatique en fonction du volume de préparation enzymatique

La préparation enzymatique est obtenue à partir de reins de lapin, elle correspond à l'étape I de la purification.

L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 10 mn à 37°C , à pH 7,4 en présence de PLP 8.10^{-5}M et de L-DOPA $3,2.10^{-3}\text{M}$.

Méthodes utilisant un substrat marqué au ^{14}C

Ces méthodes sont toutes fondées sur le même principe. I substrat, marqué au ^{14}C soit uniformément soit seulement sur le carboxyle, produit au cours de la réaction enzymatique du $^{14}\text{CO}_2$. Celui-ci est déplacé du milieu de réaction par un acide puis est fixé par une solution alcaline dont on mesure la radioactivité par scintillation liquide. Les différentes méthodes ne se distinguent les unes des autres que par la nature de la base employée pour fixer le $^{14}\text{CO}_2$ et le dispositif technique utilisé.

Certaines méthodes bien que mises au point pour doser l'histidine décarboxylase peuvent convenir au dosage de la DOPA décarboxylase, c'est pourquoi nous les mentionnerons ici.

Parmi les bases le plus souvent utilisées pour fixer le $^{14}\text{CO}_2$ figurent la potasse (113, 70), la phényléthylamine (2, 110) et l'hyamine (1, 85, 6, 89). La solution alcaline peut être placée dans le godet central de l'espace principal d'un flacon de Warburg (6) ou bien elle peut imprégner un papier filtre (89) qui est disposé dans l'atmosphère au dessus du milieu de réaction et qui est ensuite dispersé dans le mélange scintillant (25).

Certains auteurs ont conçu des dispositifs particuliers pour réaliser la séparation du $^{14}\text{CO}_2$. Ainsi Aures et Clark (2) utilisent un flacon de réaction de forme conique relié à son embouchure par un joint de caoutchouc à une ampoule cylindrique contenant la solution alcaline. L'ensemble, maintenu dans la position horizontale, est entraîné par un appareil rotatif. Ropp et Furst (110) ont imaginé, pour leur part, un montage qui présente l'avantage sur le précédent d'éliminer les risques de projection du milieu de réaction dans la chambre de diffusion. Il s'agit de deux ballons qui communiquent par des manchons latéraux rodés.

La plupart des techniques utilisées présentent l'inconvénient d'avoir à transvaser la solution alcaline radioactive de la chambre de diffusion dans le flacon à scintillation. A ce point de vue le dispositif de Saba et di Luzio (113) est intéressant. Il permet de recueillir directement

le $^{14}\text{CO}_2$ dans le flacon où est mesurée la radioactivité. Il comprend une fiole conique où a lieu la réaction enzymatique et un flacon à scintillation. Fiole et flacon sont reliés par un joint en téflon.

Pour obtenir une meilleure récupération du $^{14}\text{CO}_2$, certains auteurs préconisent l'addition de bicarbonate ou de carbonate de sodium au milieu de réaction une fois la réaction terminée (2, 110).

Enfin nous voudrions faire remarquer que toutes ces méthodes récentes présentent l'avantage d'être sensibles et spécifiques, de par l'emploi d'un substrat radioactif, mais que les manipulations qu'elles nécessitent paraissent assez longues.

Méthode automatique.-

Une mesure d'activité enzymatique comporte deux phases successives: la réaction enzymatique proprement dite et le dosage de l'un des produits formés. Il est possible de réaliser ces deux phases par voie automatique.

La méthode automatique permet d'effectuer des mesures en série, néanmoins elle n'est pas encore très utilisée en enzymologie.

En ce qui concerne la DOPA décarboxylase, Scheuerbrandt a proposé une mesure automatique de son activité en présence d'ortho-tyrosine (115). Nous mêmes avons mis au point un dosage automatique de décarboxylases d'acides aminés qui s'applique à la mesure de l'activité de la DOPA décarboxylase en présence de L-DOPA (27).

Le montage que nous avons réalisé est plus simple que celui de Scheuerbrandt. Celui-ci dialysait les préparations enzymatiques avant le dosage dans le but d'éliminer le CO_2 dissous. Nous avons supprimé cette opération qui compliquait le circuit analytique et nous déterminons la teneur en CO_2 des échantillons enzymatiques en effectuant des dosages en l'absence de substrat et de coenzyme. En outre notre montage permet de réaliser une incubation entre l'enzyme et le coenzyme avant l'introduction du substrat dans le circuit analytique. Dans le cas de la L-DOPA, substrat que nous utilisons, cela évite la formation d'un dérivé inhibiteur de

l'enzyme entre le PLP et la L-DOPA (116). Comme dans la méthode de Scheuerbrandt nous dosons le CO_2 par colorimétrie.

Appareil

Nous utilisons certains éléments de l'"Autoanalyzer Technicon" :

- un distributeur d'échantillons modèle "Sampler II"
- une pompe péristaltique proportionnante
- un colorimètre à cuve tubulaire
- un enregistreur.

Circuit analytique

La figure 7 représente le schéma de montage, on peut y suivre le déroulement du dosage.

La préparation enzymatique est aspirée à la cadence de 40 échantillons par heure. La solution de PLP, segmentée par des bulles d'air exempt de CO_2 , est mise en contact avec l'échantillon enzymatique pendant 2 min 30 s, puis après introduction de la solution de substrat dans le circuit, la réaction enzymatique a lieu pendant 15 mn dans une bobine de délai placée dans un bain-marie à 37°C. A la sortie de la bobine de délai un courant d'acide sulfurique dilué arrête la décarboxylation et déplace le CO_2 formé. Le mélange gaz-liquide est porté à 45°C puis arrive dans un séparateur qui envoie le liquide vers l'évier et le gaz vers une solution alcaline de phénolphtaléine. La variation de pH provoquée par l'arrivée du CO_2 se traduit par une décoloration de la phénolphtaléine. Après élimination des bulles d'air la solution de phénolphtaléine traverse la cuve à flux continu du colorimètre. Le pourcentage de lumière transmise à 550 nm est indiquée par l'enregistreur. A chaque échantillon enzymatique correspond un pic sur l'enregistreur.

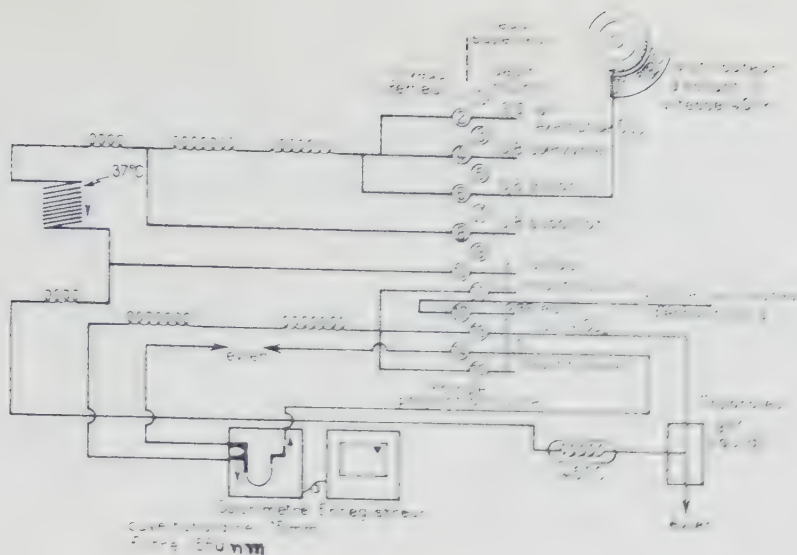


Fig. 7.- Dosage automatique de la DOPA décarboxylase.

réactif acide	: acide sulfurique concentré	2,8 ml
	eau distillée q.s.p.	1000 ml
solution tampon	: carbonate de sodium 1M	1 volume
	bicarbonate de sodium 1M	2 volumes
réactif coloré	: solution tampon	2 ml
	solution de phénolphthaléine	
	dans le méthanol (1 p. 100)	1,2 ml
	eau distillée q.s.p.	1000 ml

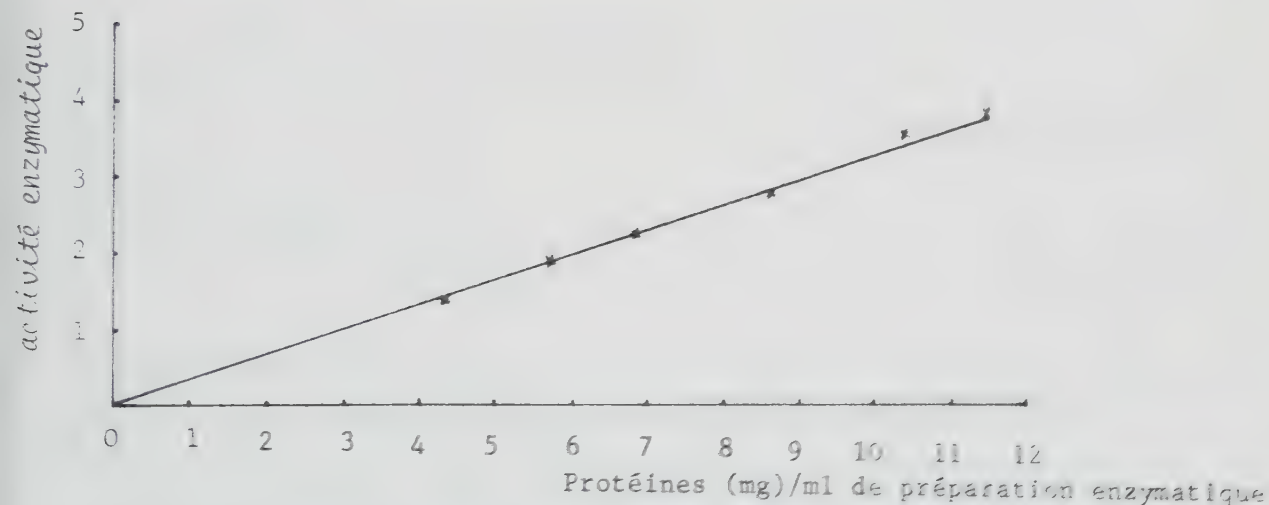


Fig. 8.- Dosage automatique de la DOPA décarboxylase -

Activité enzymatique en fonction de la concentration en protéines de la préparation enzymatique.

La préparation enzymatique est obtenue à partir de reins de lapin, Elle correspond à l'étape I de la purification.

- L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé par ml de préparation enzymatique - La réaction a lieu à 37°C , à pH 7,4, pendant 15 mn.

Solution de L-DOPA : $8 \cdot 10^{-3}\text{M}$ - Solution de PLP : $4 \cdot 10^{-4}\text{M}$

Les réactifs sont préparés au moment de l'emploi avec de l'eau ou avec une solution de tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4 privées de CO_2 par ébullition. Pendant le dosage les réactifs sont maintenus en contact avec de l'air exempt de CO_2 .

l'appareil est étalonné avant chaque série de mesures à l'aide de solutions de carbonate de sodium de concentrations connues.

Ce montage nous a permis de mesurer l'activité des décarboxylases suivantes : DOPA décarboxylase de reins de lapin, tyrosine décarboxylase et glutamate décarboxylase d'*Escherichia Coli*.

Résultats

Nous indiquons ici les résultats obtenus avec la DOPA décarboxylase.

Les résultats sont exprimés en μ moles de CO_2 formé par ml de préparation enzymatique.

La figure 8 montre que la quantité de CO_2 formé pendant la réaction enzymatique est proportionnelle à la concentration en protéines de la préparation enzymatique.

Sensibilité - Il est possible de mesurer une activité enzymatique correspondant à un dégagement de CO_2 égal à 0,2 μ mole.

Précision - Les résultats donnés dans les colonnes b et c du tableau 3 correspondent à deux séries de mesures effectuées par voie automatique.

On peut constater que ces résultats sont sensiblement moins dispersés que ceux fournis par la méthode manométrique (colonne a).

TABLEAU 3.

sage de la DOPA décarboxylase - Précision et comparaison des résultats :
colonne a : méthode manométrique; colonnes b et c : méthode automatique

		a	b	c
		4,65	2,75	3,10
		4,95	2,80	2,95
		4,88	2,55	3,25
		4,68	2,65	3,12
		4,98	2,80	3,35
		4,45	2,85	3,40
		4,19	2,88	3,48
		5,22	2,98	3,50
		4,33	3,05	
			3,00	
			3,10	
			3,10	
nombre d'essais	n	9	12	8
moyenne	$\bar{x}$	4,7	2,87	3,27
écart type	σ	0,34	0,176	0,20
limites de confiance (probabilité: 95 p. 100)	$\bar{x} \pm \sigma t$	$4,70 \pm 0,78$	$2,87 \pm 0,39$	$3,27 \pm 0,47$
erreur relative	$\pm \frac{100 \sigma}{\bar{x}}$	$\pm 5,3$	$\pm 3,8$	$\pm 4,9$

- Les résultats représentent le nombre de μ moles de CO_2 formé à 37°C , à pH 7,4 en 15 mn, pour 1 ml de préparation enzymatique, en présence de L-DOPA - (a : $3,2 \cdot 10^{-3} \text{M}$, b et c : $2,6 \cdot 10^{-3} \text{M}$) et de PLP (a : $8 \cdot 10^{-5} \text{M}$, b et c : $13 \cdot 10^{-5} \text{M}$).
- Les préparations enzymatiques sont obtenues à partir de reins de lapin, elles correspondent à l'étape I de la purification. Les déterminations de chacune des séries a, b et c sont effectuées avec la même préparation enzymatique.

2^{ième} Groupe : Dosage de la dopamine

La DOPA décarboxylase catalyse en plus de la décarboxylation de la DOPA celle du 5-HTP. Il se forme de l'hydroxytryptamine ou sérotonine. Nous examinerons donc les méthodes qui dosent la sérotonine; leur principe est du reste identique à celui des méthodes de mesure de la dopamine.

Nous n'envisagerons pas ici les dosages physiologiques de ces amines.

Toutes les méthodes de mesure de l'activité de la DOPA décarboxylase fondées sur le dosage de l'amine formée au cours de la réaction comporte une séparation préliminaire de l'amine et de l'acide aminé substrat non transformé.

Certains auteurs extraient l'amine du milieu de réaction par un solvant organique (32, 87). D'autres préfèrent opérer par chromatographie sur colonne. Ils emploient des résines échangeuses d'ions : permutite (42, 90) ou amberlite CG 50 (37,28) qui retiennent les amines et laissent passer les acides aminés. Les amines sont ensuite éluées par un solvant approprié. Aures et coll. utilisent de la DOPA et du 5-HTP marqués au ^{14}C et les séparent des amines formées par chromatographie en couche mince de gel de silice (3). Somerville sépare la dopamine et la sérotonine marquées au ^{14}C des acides aminés correspondants soit par électrophorèse, soit par chromatographie sur papier (120).

L'amine une fois séparée de l'acide aminé substrat non transformé est dosée par spectrophotométrie (32, 37, 28, 122) ou par fluorimétrie (18, 86, 90). S'il s'agit d'amines marquées au ^{14}C leur radioactivité est mesurée par scintillation liquide (120,3,87).

Il faut noter que pour éviter l'oxydation de l'amine par la mono amine oxydase présente dans les milieux contenant une préparation enzymatique non purifiée, le dosage est effectué en présence d'un inhibiteur de la mono amine oxydase, le plus souvent l'iproniazide.

Ces méthodes de dosage de l'activité enzymatique qui nécessitent une extraction ou une séparation chromatographique ne donnent pas toujours de bons résultats. En particulier celles qui utilisent les résines échangeuses d'ions sont sujettes à caution. En effet, elles ne conviennent pas au dosage de très faibles quantités d'amine en présence d'un grand excès d'acide aminé substrat (6).

Néanmoins la méthode mise au point par P. Laduron et F. Belpaire (87) nous paraît intéressante par sa rapidité d'exécution. Elle consiste simplement à extraire la dopamine formée à partir de L-DOPA marquée au ^{14}C par du n-butanol puis à mesurer la radioactivité d'une partie aliquote de l'extrait par scintillation liquide. La faible quantité de L-DOPA entraînée par le n-butanol peut être déterminée en effectuant une mesure sans enzyme.

En conclusion, il semble que progressivement la méthode manométrique soit remplacée par les méthodes utilisant un substrat marqué au ^{14}C , en particulier celles fondées sur la mesure du $^{14}\text{CO}_2$. Ces méthodes sont plus sensibles que la méthode manométrique. Elles permettent de mesurer des activités enzymatiques basses et d'étudier la répartition de la DOPA décarboxylase dans des tissus de faible volume (3). Quant à la méthode automatique, elle donne la possibilité d'effectuer des mesures en série, ce qui représente un réel avantage pour suivre une purification.

PURIFICATION DE LA DOPA DECARBOXYLASE

La purification que nous avons réalisée comprend trois phases successives.

Etape I : *extraction de l'enzyme* -

Nous avons effectué cette première opération en évitant autant que possible d'entraîner des protéines étrangères : protéines des membranes cellulaires, protéines et nucléoprotéines des particules cellulaires. Nous décrirons cette première étape et nous indiquerons quelques caractères de l'extrait obtenu.

Etape II : *fractionnement des protéines de l'extrait* -

Nous avons essayé de fractionner les protéines contenues dans l'extrait par les méthodes suivantes :

fractionnement par la chaleur

fractionnement par un acide

fractionnement par le sulfate d'ammonium.

Nous exposerons les résultats que nous avons obtenus avec chacune de ces méthodes et nous indiquerons le procédé retenu.

Etape III : *enrichissement de la fraction active* -

Nous avons cherché à enrichir la fraction active obtenue à l'étape II en réalisant une séparation chromatographique sur DEAE-sephadex.

Nous donnerons les résultats auxquels nous sommes parvenue.

La purification est suivie en déterminant l'activité enzymatique des préparations obtenues après chaque opération. L'activité spécifique est exprimée en n moles de CO_2 dégagé (ou de substrat décarboxylé), à pH 7,4 et à 37°C , par mg de protéines et par minute en présence de L-DOPA $3,2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ et de PLP $8 \cdot 10^{-5}\text{M}$.

Etape I .-

1°) Matériel

Après avoir fait une tentative de purification à partir de reins de porc, nous avons abandonné ce matériel. En effet, les reins étaient prélevés sur des animaux tués à l'abattoir et étaient ensuite transportés jusqu'au laboratoire à l'état congelé. Or la congélation présentait l'inconvénient de détruire les structures cellulaires et par conséquent de fournir des préparations riches en protéines autres que l'enzyme souhaitée. Nous avons donc préféré utiliser des reins de lapin. Les animaux étaient élevés sur place et les reins pouvaient être employés immédiatement après que les animaux aient été sacrifiés. Il était possible de perfuser les organes avant qu'ils soient prélevés.

La perfusion élimine le sang contenu dans les tissus et permet ainsi de réaliser une première purification. Nous avons effectivement constaté, par électrophorèse sur gel d'acétate de cellulose, que les extraits préparés à partir de reins perfusés étaient exempts de certaines fractions protéiques dépourvues d'activité enzymatique.

2°) Mode opératoire

Les animaux sont sacrifiés par section de la carotide puis une solution de chlorure de sodium (9 g/litre) à 0°C est injectée dans l'artère rénale. La perfusion est poursuivie jusqu'à décoloration du rein et du liquide éliminé par la veine rénale. Au fur et à mesure des prélèvements les reins sont placés sur de la glace. Ils sont ensuite essuyés, dégraissés et pesés. Les reins sont homogénéisés dans trois volumes de solution de saccharose 0,25 M à 0°C à l'aide d'un appareil du type "Waring blender". Pendant cette opération la température du milieu ne doit pas dépasser 5°C. Après un séjour de 60 mn à une température comprise entre 0 et 5°C, l'homogénat est centrifugé à 10.000 g pendant 30 mn dans une centrifugeuse MSE High Speed 18 réfrigérée. La température est maintenue aux environs de 1°C.

Après centrifugation, le gâteau de graisse surmontant le liquide surnageant est éliminé ainsi que le culot constitué par des cellules, des débris de cellules et des particules cellulaires (noyaux, mitochondries).

L'extrait est alors centrifugé pendant 3 heures à 30.000 g dans les mêmes conditions de température que précédemment. Le liquide surnageant est séparé du culot de particules cellulaires. Il est conservé à 0°C.

3°) Conservation de l'extrait enzymatique

Sur la figure 9 nous avons représenté la diminution de l'activité spécifique des préparations enzymatiques au cours de leur conservation. La perte d'activité est variable selon les extraits. Néanmoins on observe une baisse rapide durant les trois premiers jours puis une diminution plus lente de l'activité.

La perfusion des reins n'a pas d'influence sur la conservation des extraits.

Nous avons essayé de stabiliser l'activité d'une préparation enzymatique en la conservant en présence de PLP ou de bromure d'amino-éthylisothio-urée (AET) (123). Nous n'avons pas observé que l'emploi de ces composés améliore la conservation de la préparation enzymatique (fig. 10)

4°) Action du pH sur l'extrait enzymatique

Nous avons mesuré l'activité enzymatique d'une préparation maintenue pendant 24 heures à différents pH. Nous avons pu constater que l'activité décarboxylasique reste stable dans une zone de pH allant de 6 à 7,7 (fig. 11).

5°) Action de la dialyse sur l'extrait enzymatique

Nous avons examiné l'influence de la dialyse de courte durée sur l'activité enzymatique. Le tableau 4 indique que l'extrait dialysé contre de l'eau distillée (a) perd une partie de son activité. Il y a dénaturation et

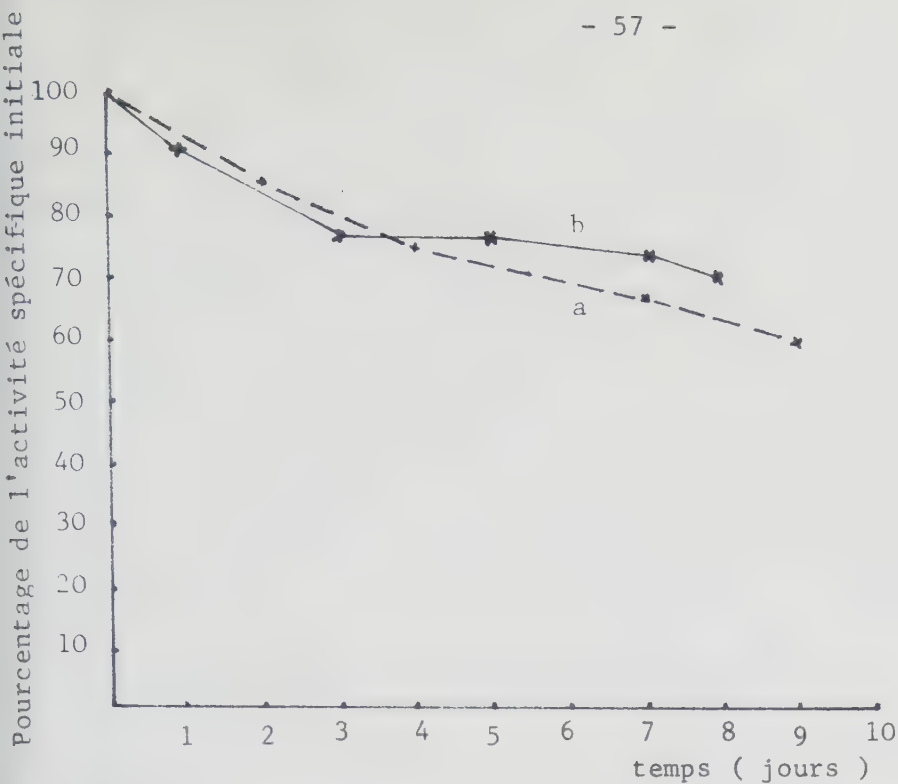


Fig. 9.- Conservation de préparations de DOPA décarboxylase.

Les préparations enzymatiques correspondent à l'étape I de la purification. Elles sont obtenues à partir de reins de lapin perfusés (a) ou non perfusés (b)

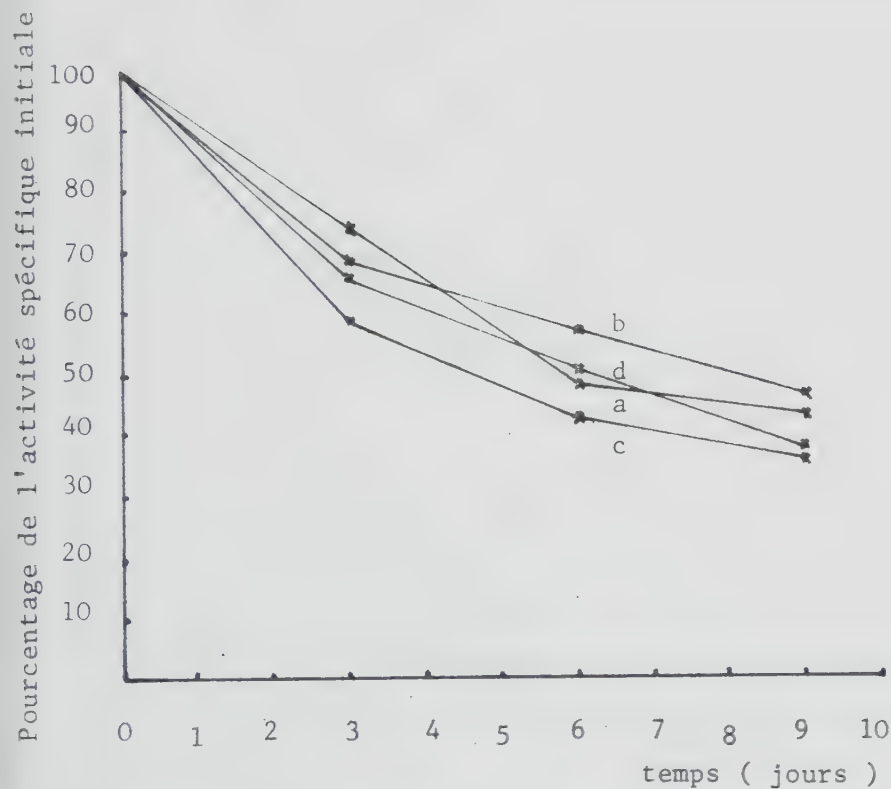


Fig. 10.- Conservation d'une préparation de DOPA décarboxylase en présence de PLP et d'AET.

La préparation enzymatique correspond à l'étape I de la purification. Elle est conservée à 0°C seule (a) ou en présence de PLP $10^{-4}M$ (b), d'AET $10^{-3}M$ (c), de PLP $10^{-4}M$ et d'AET $10^{-3}M$ (d)

TABLEAU 4.

Action de la dialyse sur les préparations de DOPA décarboxylase

			dialyse	Activité spécifique
préparation enzymatique			0	7
" "	(a)		+	4,5
préparation enzymatique			0	10
" "	(b)		+	11
" "	(c)		+	11

- La dialyse a lieu à une température comprise entre 0 et 5°C pendant 5 h contre de l'eau distillée (a), contre une solution tampon de phosphates $5.10^{-2}M$ pH 7,4 (b), contre la même solution tampon additionnée de PLP $10^{-4}M$ (c).
- Les préparations de DOPA décarboxylase sont obtenues à partir de reins de lapin perfusés. Les reins sont homogénéisés dans une solution de saccharose 0,25M. Puis l'homogénat est centrifugé pendant 3 h à 30.000 g.

précipitation des protéines. La dialyse contre une solution tampon de phosphates seule (b) ou additionnée de PLP (c) n'entraîne pas de perte d'activité décarboxylasique.

Etape II .-

1°) Fractionnement par la chaleur

Awapara et coll. commencent la purification de la DOPA décarboxylase de foies de rats par une précipitation thermique de l'homogénat (7).

Nous avons essayé ce mode de fractionnement sur l'homogénat centrifugé. Celui-ci, par portion de 20 ml, est amené à 55°C puis maintenu pendant 1 minute à cette température. Il est ensuite refroidi rapidement dans un bain de glace puis centrifugé pendant 20 mn à 30.000 g. Le surnageant est recueilli et le culot protéique éliminé. La précipitation thermique est effectuée sur l'extrait additionné de PLP 10^{-4} M et de ME 10^{-3} M pour éviter la dénaturation de l'enzyme. Le séjour à 55°C ne doit pas dépasser 2 mn sinon l'enzyme perd son activité.

Résultats (tableau 5)

Le rendement de l'opération est bon mais l'activité enzymatique augmente faiblement. Nous n'avons pas retenu ce mode de fractionnement.

2°) Fractionnement par un acide

La figure 11 indique qu'après un séjour de 24 heures à pH 5 l'extrait conserve 80 p. 100 de son activité. l'enzyme est donc relativement stable à ce pH. Par ailleurs Fellman utilise la précipitation par un acide pour purifier la DOPA décarboxylase de glandes surrénales de boeuf (44).

Nous avons appliqué ce mode de fractionnement à l'extrait de reins de lapin. Celui-ci est amené à pH 5 par addition d'acide acétique 0,5 N.

TABLEAU 5.

Fractionnement par la chaleur

	Protéines totales mg	Activité spécifique	Activité totale	Rendement p. 100	Purification
homogénat centrifugé (a)	3.185	10,5	33.442		
surnageant chauffé (b)	2.160	13,6	29.376	88	1,3

- (a) L'homogénat est obtenu à partir de reins de lapin perfusés. Il est centrifugé pendant 3 h à 30.000 g.
- (b) L'homogénat centrifugé est additionné de PLP 10^{-4} M et de ME 10^{-3} M. il est porté à 55°C pendant 1 mn puis centrifugé pendant 20 mn à 30.000 g. Le surnageant est recueilli.

TABLEAU 6.

Fractionnement par un acide

	Protéines totales mg	Activité(*) spécifique	Activité totale	Rendement p. 100	Purification
homogénat centrifugé (a)	630	15	9.450		
surnageant acide (b)	445	18,5	8.232	87	1,2

- (a) L'homogénat est obtenu à partir de reins de lapin perfusés. Il est centrifugé pendant 3 h à 30.000 g.
- (b) L'homogénat centrifugé additionné de PLP 10^{-4} M, est amené à pH 5. Après 5 mn, la préparation est centrifugée à 30.000 g pendant 10 mn. Le surnageant est recueilli.
- (*) activité spécifique mesurée à pH 7,4

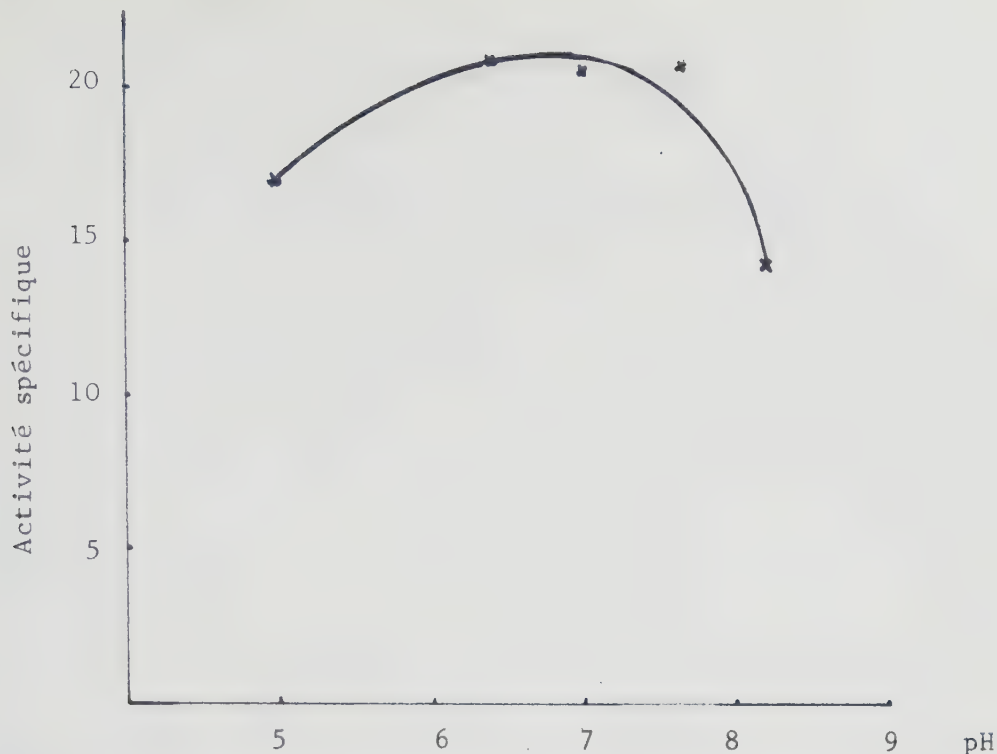


Fig. 11.- Action du pH sur une préparation de DOPA décarboxylase.

La préparation enzymatique correspond à l'étape I de la purification. Elle est additionnée de PLP $10^{-4}M$, puis maintenue à $0^{\circ}C$ pendant 24 h aux pH suivants : 5 - 6,4 - 7 - 7,7 - 8,2 - L'activité spécifique est mesurée à pH 7,4.

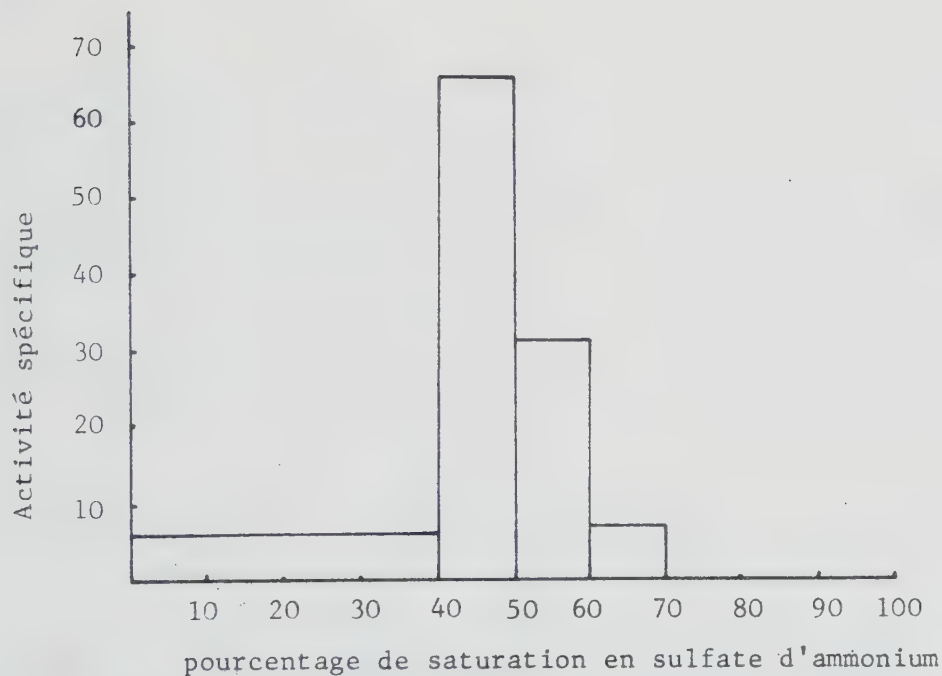


Fig. 12.- Fractionnement par le sulfate d'ammonium.

Après 5 minutes de contact, les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation à 30.000 g pendant 10 minutes. Le pH du surnageant est ajusté à 7 par addition d'une solution de phosphate dipotassique 2 M. La précipitation est effectuée sur l'extrait contenant du PLP 10^{-4} M.

Résultats (tableau 6)

Ici encore le rendement de l'opération est satisfaisant mais la purification est insuffisante pour que ce mode de fractionnement soit retenu.

3°) Fractionnement par le sulfate d'ammonium

Nous avons utilisé cette méthode de fractionnement déjà employée pour purifier la DOPA décarboxylase (7, 44) en prenant un certain nombre de précautions pour éviter que l'enzyme se dénature au cours du traitement.

L'homogénat centrifugé est maintenu dans un bain de glace. Il est additionné de PLP 10^{-4} M et de ME 10^{-3} M. Son pH est ajusté à 7 à l'aide d'une solution tampon de phosphates 2.10^{-1} M pH 7,4. La solution saturée de sulfate d'ammonium est ajoutée goutte à goutte jusqu'à ce que la concentration désirée soit atteinte. La température et le pH du milieu sont contrôlés pendant l'opération. La solution saturée de sulfate d'ammonium est préparée à partir de sulfate d'ammonium Merck pour usages biochimiques recristallisé en présence d'EDTA. Son pH est ajusté à 7 par addition d'ammoniaque juste avant l'emploi. Elle contient de l'EDTA 10^{-4} M. Après 15 minutes de contact les protéines précipitées sont recueillies par centrifugation à 30.000 g pendant 10 minutes puis mises en solution dans du tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4.

Résultats (fig. 12, tableau 7)

La fraction protéique précipitée entre 40 et 50 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium est la plus active. L'activité spécifique des protéines ainsi recueillies est trois fois plus forte que celle de

TABLEAU 7.

Fractionnement par le sulfate d'ammonium

	Protéines totales mg	Activité spécifique	Activité totale	Rendement p. 100	Purification
homogénat centrifugé (a)	1.200	21	25.200		
- 40 % (b)	212	6,6	1.400		
- 50 %	131	65,7	8.600	34	3,1
- 60 %	126	31,6	3.981	15,8	1,5
- 70 %	100	6,9	690		
homogénat centrifugé	1.320	23	30.360		
- 55 %	224	62,1	13.910	46	2,7

l'homogénat est obtenu à partir de reins de lapin perfusés. Il est centrifugé pendant 3 h à 30.000 g.

pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium auxquels les protéines précipitent et sont recueillies

l'extrait et le rendement est acceptable. La présence de saccharose dans l'extrait ne gêne pas la précipitation. En effet, les résultats obtenus en opérant avec un extrait privé de saccharose par dialyse sont identiques aux précédents.

Nous avons retenu ce procédé de fractionnement. Pour améliorer le rendement nous avons récupéré les protéines précipitées entre 40 et 55 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. Le taux de purification n'est que légèrement abaissé (tableau 7).

Les protéines recueillies ont été soumises à la filtration sur gel de sephadex G-25 "fine" afin de les priver de sulfate d'ammonium.

Nous avons préféré cette technique à la simple dialyse car elle est plus efficace et plus rapide.

La filtration est réalisée en chambre froide. Le sephadex est mis en suspension dans du tampon de phosphates $5.10^{-2}M$, pH 7, ou dans du tampon tris $5.10^{-2}M$, pH 7 (technique décrite au chapitre I). Les protéines filtrées donnent une réaction négative avec le réactif de Nessler (30). Elles ne renferment plus d'ions ammonium. Leur activité spécifique est la même que celle mesurée avant filtration (tableau 8).

Etape III .-

Nous avons fixé sur un échangeur anionique, le DEAE-sephadex, les protéines précipitées entre 40 et 55 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium, puis nous les avons éluées sélectivement par des solutions de force ionique croissante. Nous avons utilisé le tampon tris $5.10^{-2}M$, pH 7, 0,044 N en Cl^{-} dont nous avons augmenté la teneur en ions Cl^{-} par addition de chlorure de sodium.

Le DEAE-sephadex a été préparé selon la technique décrite au chapitre I.

TABLEAU 8.

Fractionnement par le sulfate d'ammonium
et filtration sur sephadex

		Protéines totales mg	Activité spécifique	Activité totale	Rendement p. 100	Purification
homogénat centrifugé	(a)	2.075	29,8	61.835		
0 - 55 %	(b)	370	78,5	29.045	47	2,6
filtrat	(c)	203	78,5	15.935	26	2,6

homogénat, obtenu à partir de reins de lapin perfusés et centrifugé pendant 3 h
à 30.000 g.

fraction protéique recueillie entre 40 et 55 p. 100 de saturation en sulfate
d'ammonium

protéines privées de sulfate d'ammonium par filtration sur gel de sephadex
G 25 "fine".

1°) Expériences en cuve

Nous avons utilisé la technique en cuve pour nos essais d'orientation en raison de la rapidité de cette méthode.

Ces essais nous ont permis d'une part de vérifier que les protéines recueillies à l'étape II se fixent sur la résine échangeuse d'ions et d'autre part d'étudier les conditions dans lesquelles elles peuvent en être détachées.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent que les protéines précipitées par le sulfate d'ammonium entre 40 et 55 p. 100 de saturation sont adsorbées sur le DEAE-sephadex préalablement équilibré avec du tampon de tris $5.10^{-2}M$, pH 7, $0,044N$ en Cl^{-} et qu'elles sont éluées par du tampon de tris $5.10^{-2}M$, pH 7, $1N$ en Cl^{-} . L'éluat, concentré par dialyse contre une solution de polyvinylpyrrolidone (108), a une activité spécifique égale à celle des protéines non traitées. Ce résultat montre que la force ionique de l'éluant est suffisante pour provoquer la désorption de toutes les protéines.

2°) Expériences sur colonnes

Dans ces expériences, après avoir fixé les protéines obtenues à l'étape II sur le DEAE-sephadex dans les conditions décrites ci-dessus, nous avons réalisé des éluations successives à l'aide de solutions tampons de tris de force ionique croissante. Le diagramme d'éluat obtenu est représenté sur la figure 13. Les protéines, au fur et à mesure de leur désorption, apparaissent dans l'éluat. L'enzyme est élué quand la concentration en Cl^{-} de l'éluant est égale à $0,193N$. L'activité spécifique des protéines ainsi recueillies est égale à 445 (tableau 9).

La chromatographie sur DEAE-sephadex permet d'obtenir une préparation enzymatique 22 fois plus active que l'extrait de départ. Le rendement est de 15 p. 100.

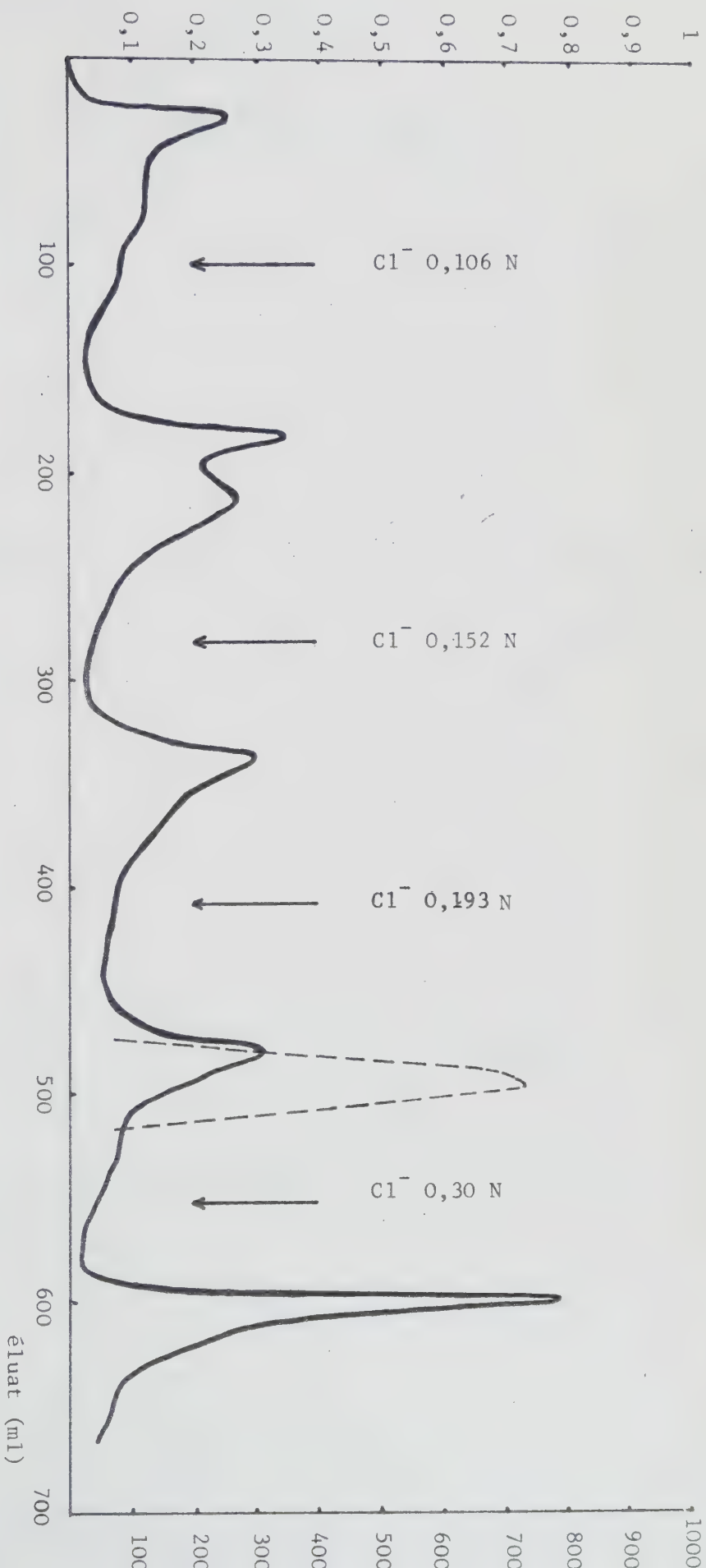


Fig. 13.- Chromatographie sur DEAE-sephadex des protéines précipitées par le sulfate d'ammonium.

DEAE-sephadex : 2,2 g - le DEAE-sephadex est équilibré avec du tampon tris 5.10^{-2}M , pH 7, $0,044\text{ N}$ en Cl^- hauteur du gel = 245 mm - diamètre de la colonne = 18 mm.

Protéines : 200 mg - elles ont été recueillies entre 40 et 55 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium puis mises en solution dans du tampon tris 5.10^{-2}M , pH 7, $0,044\text{ N}$ en Cl^- et privées de sulfate d'ammonium par filtration sur sephadex G-25 dans le même tampon.

Chromatographie : elle est réalisée en chambre froide - débit de la colonne = 25 ml/h - l'éluat est recueilli par fraction de 2,5 ml. Les flèches correspondent aux changements de tampon.

Diagramme d'éluat : densité optique à 278 nm : trait plein
activité spécifique : trait discontinu.

TABLEAU 9.

Purification de la DOPA décarboxylase

	Protéines totales mg	Activité spécifique	Activité totale	Rendement p. 100	Purification
homogénat centrifugé (a)	2.970	20	59.400		
40 - 55 % (b)	492	56	27.552	46	2,8
filtrat (c)	270	56	15.120	25	2,8
éluat (d)	20	445	8.900	15	22

Etape I - (a) homogénat de reins de lapin centrifugé à 30.000 g pendant 3 h.

Etape II - (b) fraction protéique recueillie entre 40 et 55 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium.

(c) protéines privées de sulfate d'ammonium par filtration sur sephadex G 25 "fine".

Etape III - (d) protéines séparées par chromatographie sur DEAE sephadex.

3°) Caractères de la préparation obtenue

Nous avons soumis les protéines éluées par le tampon tris $5.10^{-2}M$, pH 7, 0,193 N en Cl^{-} , à l'électrophorèse sur gel d'acétate de cellulose (technique décrite chapitre I). Ces protéines donnent une seule bande, assez large, tandis que les protéines précipitées, entre 40 et 55 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium et non chromatographiées sur DEAE-sephadex donnent 4 bandes.

Nous avons déterminé, par chromatographie en couches minces de gel de sephadex G-100, les limites entre lesquelles s'échelonnent les poids moléculaires des protéines de la préparation purifiée (technique décrite au chapitre I). Ceux-ci se répartissent entre 25.000 et 65.000).

Les protéines éluées sont très fragiles. Elles se dénaturent rapidement et perdent toute activité enzymatique en quelques heures.

Bien qu'une séparation par chromatographie sur gel de sephadex G-100 ait été envisagée, nous avons interrompu la purification de la DOPA décarboxylase à ce stade en raison de l'instabilité de la préparation obtenue.

Les préparations correspondant aux étapes I et II nous ont permis d'étudier l'activité coenzymatique des dérivés du PLP vis-à-vis de la DOPA décarboxylase et de la 5-HTP décarboxylase.

La préparation correspondant à l'étape II a été utilisée pour réaliser certaines expériences concernant le mécanisme d'action des dérivés du PLP. Nous verrons au chapitre V que ce matériel enzymatique était insuffisamment purifié pour convenir à cette étude.

La préparation correspondant à l'étape III, beaucoup plus riche en enzyme que la précédente, n'a pu être utilisée pour étudier le mécanisme d'action des dérivés du PLP à cause de son instabilité.

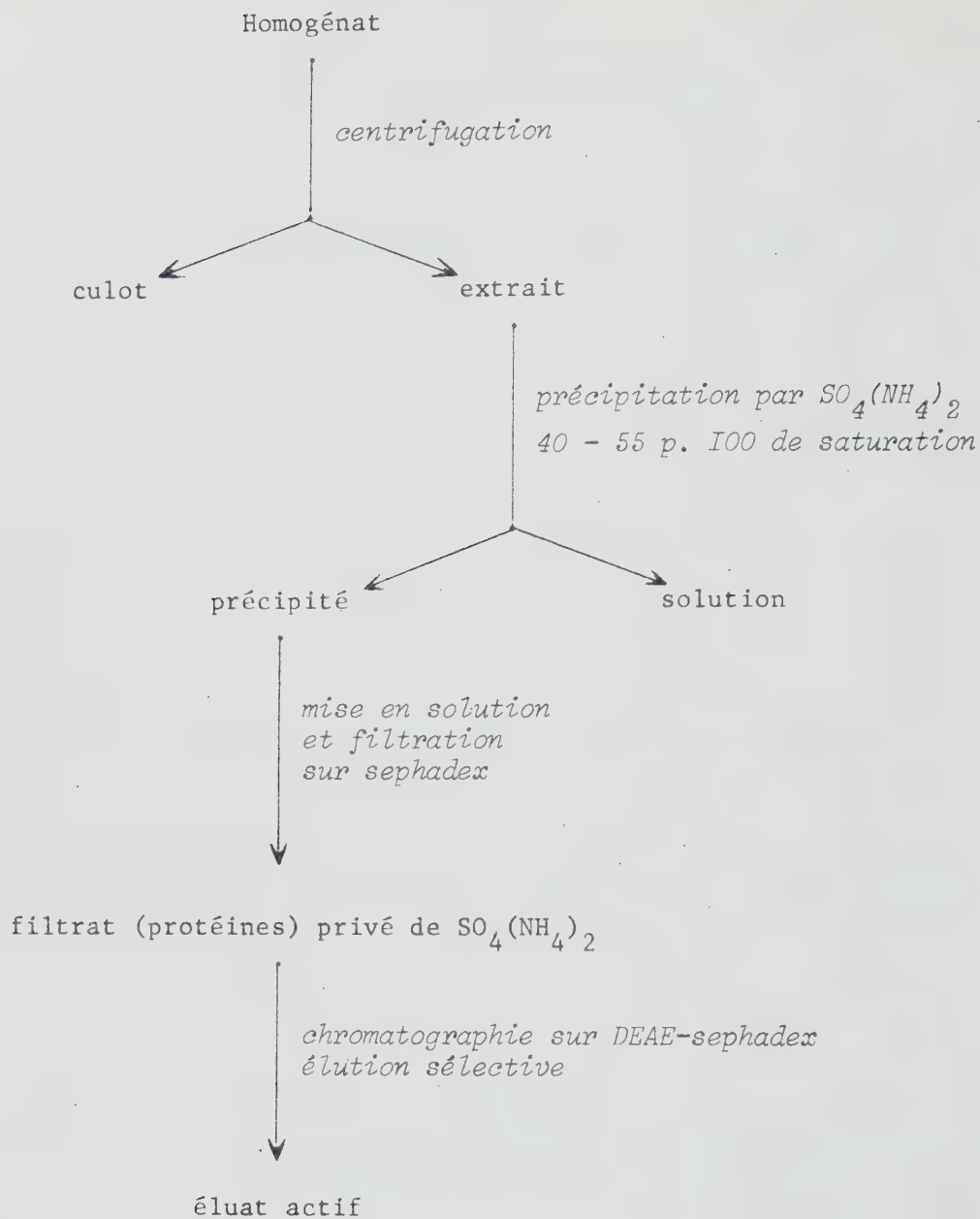


Fig. 14.- Schéma de la purification partielle de la DOPA décarboxylase

RESOLUTION DE LA DOPA DECARBOXYLASE

Les extraits obtenus à partir de reins de lapin possèdent même en l'absence de PLP, une activité enzymatique. Nous avons constaté que cette activité varie entre 15 et 30 p. 100 de la valeur de l'activité maximale déterminée en présence d'un excès de coenzyme.

Les extraits dialysés pendant 5 heures contre une solution tampon de phosphates conservent leur activité (tableau 4 - b). La dialyse de courte durée ne les prive pas de leur coenzyme.

Pour obtenir la résolution des préparations de décarboxylases il faut les traiter par un composé susceptible de réagir avec le PLP. Ainsi C. Hanly utilise l'hydroxylamine et l'o-tyrosine pour préparer l'apo-DOPA décarboxylase (communication personnelle). Klein et Sagers font agir de la cystéine sur une préparation de glycine décarboxylase pour la priver de PLP (84).

Nous avons essayé de préparer l'apo DOPA décarboxylase en traitant par la cystéine les protéines obtenues par précipitation par le sulfate d'ammonium (étape II). La cystéine se combine au PLP pour former un composé, différent d'une base de Schiff, possédant un noyau thiazolidine (94).

Nous avons constaté que ce composé active la DOPA décarboxylase (activation égale à 65 p. 100) aussi nous avons jugé nécessaire de l'éliminer en filtrant la préparation enzymatique sur gel de sephadex G-25. Pour éviter une trop grande dilution des protéines, déjà diluées par la solution de cystéine, nous avons concentré la préparation enzymatique en précipitant les protéines par le sulfate d'ammonium avant de les filtrer sur sephadex G-25.

Nous avons opéré de la manière suivante : la préparation enzymatique, obtenue en l'absence de PLP, est mise en contact pendant une heure à 0°C avec une solution de chlorhydrate de cystéine tamponnée à pH 7,4. La concentration de la cystéine dans le milieu est égale à 10^{-1} M. Ensuite les protéines sont précipitées par le sulfate d'ammonium à 55 p. 100 de saturation puis filtrées sur une colonne de gel de sephadex G-25.

Résultat (tableau 10)

Les préparations traitées par la cystéine perdent environ la moitié de leur activité spécifique, mesurée en l'absence de PLP. Il ne s'agit pas d'une dénaturation de l'apoenzyme mais d'une résolution partielle car l'activité maximale, déterminée en présence d'un excès de PLP, n'est pas diminuée.

TABLEAU 10.

Résolution partielle de la DOPA décarboxylase

	<u>activité spécifique</u>	
	mesurée en l'absence de PLP	mesurée en présence de PLP
avant traitement	15,1	58
après traitement	7,2	60

La préparation enzymatique (étape II) est obtenue à partir de reins de lapin perfusés. La précipitation par le sulfate d'ammonium est effectuée en l'absence de PLP.

Traitement par la cystéine : les protéines sont mises en contact pendant 1 h à 0°C avec la cystéine (concentration dans le milieu = 10^{-1} M) puis précipitées par le sulfate d'ammonium à 55 p. 100 de saturation et filtrées sur gel de sephadex G-25 "fine".

Activité spécifique : l'activité est mesurée, d'une part, en l'absence de PLP et d'autre part, en présence de PLP 8.10^{-5} M.

Chapitre IV

ACTION DES DERIVES DU PLP SUR LES PYRIDOXALOENZYMES

Nous avons étudié l'action des dérivés du PLP décrits au chapitre II sur les enzymes suivantes : tyrosine décarboxylase, DOPA décarboxylase, 5-HTP décarboxylase, TSase, AAT (les noms systématiques des enzymes ont été donnés au chapitre I). Cette étude s'intègre dans l'ensemble des recherches réalisées par Gonnard et coll. sur le rôle coenzymatique des dérivés du PLP.

Ces recherches débutèrent vers 1957 dans les circonstances suivantes. A cette date, des études pharmacologiques et biochimiques venaient de montrer que l'isoniazide (INH), composé utilisé en thérapeutique exerçait une action inhibitrice sur plusieurs enzymes, en particulier, des enzymes ayant pour cofacteur le PLP (10, 83, 82, 23). Cette inhibition avait d'abord été attribuée à une analogie de structure entre l'INH et le PLP (136, 135, 111, 22). Puis à la suite des travaux de Vilter et coll. (129) et de Davison (39) on considéra qu'elle était due au fait que l'INH pouvait réagir avec la fonction aldéhyde du PLP pour former une hydrazone. Le coenzyme ainsi lié à l'INH ne pouvait plus jouer son rôle catalytique puisque pour cela, selon la théorie de Braunstein et de Snell, il devait se combiner à l'acide aminé substrat sous forme de base de Schiff.

P. Gonnard, qui avait déjà étudié l'action de l'INH sur l'oxydation catalytique de la L-DOPA (61) chercha alors à déterminer la plus petite concentration d'INH pouvant inhiber la DOPA décarboxylase. Il constata qu'en dessous d'une certaine limite l'inhibition provoquée par l'INH disparaissait pour faire place à une activation (62). Il en déduisit que la combinaison

de l'INH et du PLP, c'est-à-dire l'hydrazone, se comporte comme un activateur de l'enzyme. En même temps, D. Palm (104) observait que la décarboxylation enzymatique de la L-DOPA était pratiquement complète en présence de PLP incubé avec un très léger excès d'INH, ce qui n'était pas le cas avec le coenzyme seul. Sachant que le PLP réagit avec la L-DOPA pour former un dérivé cyclique inhibiteur de la DOPA décarboxylase (116) Palm pensa que l'INH en se combinant au PLP empêchait la formation du dérivé cyclique inhibiteur. Le PLP était ensuite restitué au cours de la réaction enzymatique par une lente hydrolyse de l'hydrazone.

Ainsi fut mis en évidence le rôle coenzymatique de l'INHPLP. En même temps les deux hypothèses possibles concernant son mode d'action étaient formulées :

- selon P. Gonnard, l'INHPLP agissait par elle-même
- selon D. Palm, l'activité coenzymatique de l'INHPLP était due au PLP régénéré par hydrolyse de la molécule.

La première de ces hypothèses était en contradiction avec la théorie de Braunstein et de Snell, la seconde était en accord avec elle. Dès lors, l'étude du comportement de l'INHPLP vis-à-vis d'enzymes activées par le PLP s'imposait. Elle devait permettre d'infirmer ou de confirmer la théorie du mécanisme d'action du PLP.

P. Gonnard et J.P. Nguyen Chi préparèrent alors l'INHPLP et étudièrent son action sur la DOPA décarboxylase (63). Ensuite les recherches s'étendirent à d'autres dérivés. Un grand nombre de composés furent synthétisés en faisant réagir le PLP avec des hydrazides, des hydrazines, des composés aminés et leurs actions sur différentes enzymes pyridoxaliques furent étudiées.

Simultanément d'autres groupes de chercheurs entreprirent des études similaires. Ce sont : Bonavita et Scardi qui étudièrent les propriétés coenzymatiques de l'INHPLP vis-à-vis de l'AAT (20) et Makino et coll. qui examinèrent l'action de différents dérivés du PLP sur cette même transaminase et sur la glutamate décarboxylase (91, 92).

Récemment deux autres équipes se sont intéressées à certains dérivés du PLP, ce sont celles de R. Tapia (126) et de W.G. Clark (31, 5).

ISONICOTYLHYDRAZONE DE PLP - (INHPLP)

Comme nous venons de le rappeler, l'INHPLP a été la première hydrazone de PLP étudiée pour ses propriétés coenzymatiques. Gonnard et coll. examinèrent son action sur différentes enzymes pyridoxaliques : DOPA décarboxylase (63), AAT (64), cynurénine hydrolase (52) et glutamate décarboxylase (60). Elle s'est toujours comportée comme un activateur de l'enzyme considérée.

Nous étudierons son activité vis-à-vis de la tyrosine décarboxylase et de la TSase. Nous déterminerons les caractères essentiels de son action sur la DOPA décarboxylase et l'AAT.

Action de l'INHPLP sur la tyrosine décarboxylase.-

Nous avons mesuré la décarboxylation enzymatique de la L-tyrosine en présence d'INHPLP et de PLP à différentes concentrations. Les essais étaient réalisés avec de l'apotyrosine décarboxylase (chapitre I). Les droites de la figure 15 représentent les décarboxylations obtenues en fonction du temps de réaction. Le tableau 11 donne les vitesses initiales correspondantes.

On constate que l'activation due à l'INHPLP est environ 3,5 fois moindre que celle produite par le PLP.

Action de l'INHPLP sur la TSase β_2 .-

La TSase β_2 catalyse la synthèse du L-tryptophane à partir de la L-sérine et de l'indol en présence de PLP.

Le PLP, pendant la catalyse enzymatique, se comporte comme un deuxième substrat. Il est possible, par conséquent, de déterminer une constante de dissociation apparente (K_m) du complexe enzyme-PLP au cours de la synthèse du L-tryptophane. La valeur de cette constante est égale à $0,1.10^{-5}M$ d'après Crawford et Wilson (34). Hatanaka et coll. donnent une valeur plus élevée : $2,25.10^{-5}M$, même en présence d'ions ammonium qui favorisent la réaction enzymatique : $0,865.10^{-5}M$ (71).

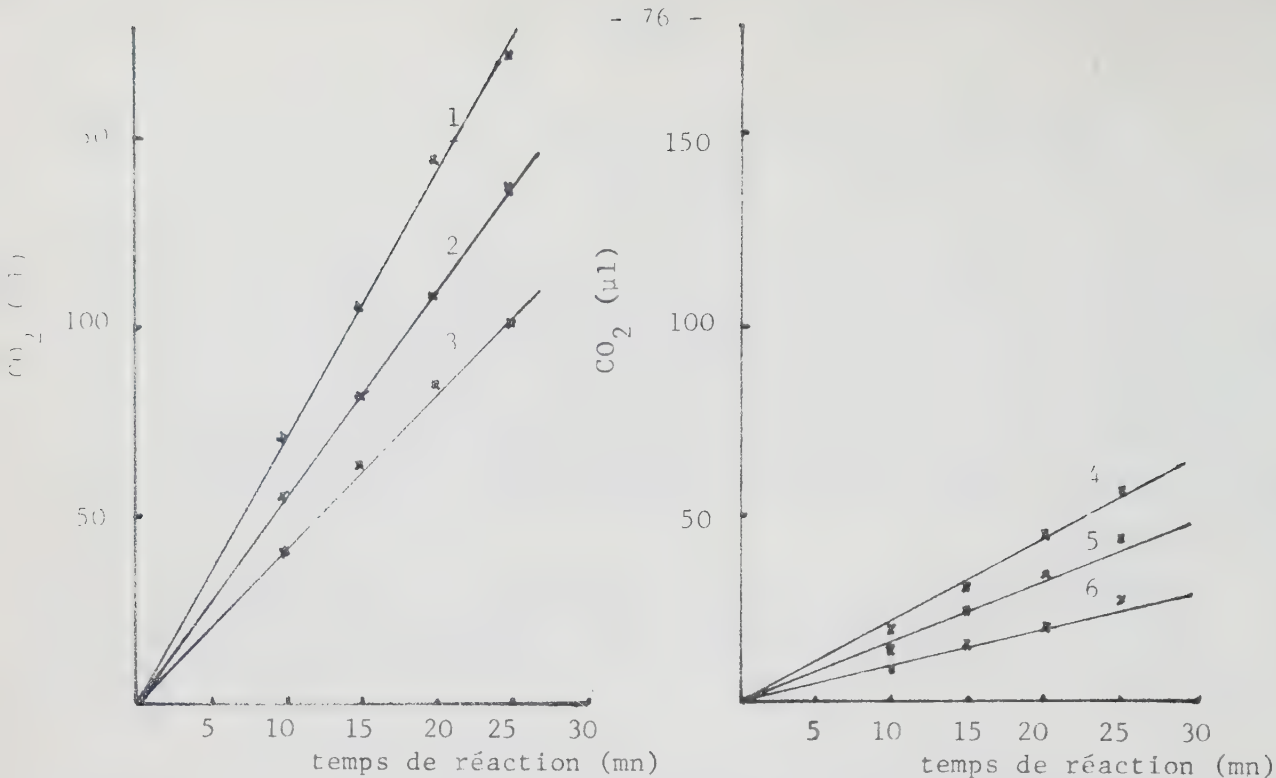


Fig. 15.- Action du PLP et de l'INHPLP sur l'apotyrosine décarboxylase.

La décarboxylation de la L-tyrosine est mesurée à pH 5,5 en présence de 0,5 ml de suspension d'apotyrosine décarboxylase (2,5 mg/ml) selon la méthode de Gunsalus (68). PLP (droites 1, 2, 3) et INHPLP (droites 4, 5, 6) : $3,3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (droites 1 et 4), $2,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (droites 2 et 5), $1,6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (droites 3 et 6).

Tableau 11.

Action du PLP et de l'INHPLP sur l'apotyrosine décarboxylase

	M/l	v_i (*)
PLP	$3,3 \cdot 10^{-8}$	14
	$2,5 \cdot 10^{-8}$	11
	$1,6 \cdot 10^{-8}$	8
INHPLP	$3,3 \cdot 10^{-8}$	4
	$2,5 \cdot 10^{-8}$	3,2
	$1,6 \cdot 10^{-8}$	2,2

(*) la vitesse initiale est exprimée en μl de CO₂ dégagé par mn et par ml de suspension d'apotyrosine décarboxylase.

Après avoir constaté, dans une expérience préliminaire, que l'INHPLP active la TSase β_2 , nous avons déterminé son K_m . Les mesures d'activité ont été réalisées à pH 7,8 en présence de *L-sérine* $10^{-2}M$, d'indol $10^{-3}M$ et de β -ME $10^{-2}M$. Le K_m de l'INHPLP est égal à $0,6 \cdot 10^{-5}M$. Il est donc du même ordre de grandeur que celui du PLP.

En outre, la vitesse maximale obtenue avec le PLP $2 \cdot 10^{-4}M$ est pratiquement atteinte avec l'INHPLP à la même concentration (tableau 12).

L'addition d'INH au milieu diminue la vitesse de réaction. L'inhibition observée est d'autant plus importante que la concentration de l'INH est plus élevée (tableau 12).

Action de l'INHPLP sur la DOPA décarboxylase.-

L'INHPLP active la DOPA décarboxylase (63). Pour comparer son action à celle du PLP nous avons mesuré l'activité de la DOPA décarboxylase à différentes concentrations de PLP et INHPLP.

Les courbes de la figure 16 représentent la variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de l'effecteur : PLP et INHPLP.

Les deux courbes sont semblables. D'une part, l'activité maximale est la même dans les deux cas et elle est obtenue avec des concentrations de PLP et d'INHPLP égales ($0,7 \cdot 10^{-5}M$). D'autre part, l'activité correspondant à la moitié de l'activité maximale est obtenue avec des concentrations très voisines de PLP ($0,25 \cdot 10^{-5}M$) et d'INHPLP ($0,20 \cdot 10^{-5}M$). Ces deux valeurs sont intéressantes. Elles permettent de comparer les affinités des effecteurs pour l'enzyme. En effet, étant donné que la décarboxylation enzymatique de la DOPA est maximale seulement en présence d'un excès de PLP (7), on peut penser que le coenzyme se comporte comme un substrat et qu'il est renouvelé au cours de la réaction, à la surface de l'enzyme. La constante de dissociation apparente du complexe enzyme-PLP est donnée par la concentration de PLP qui permet d'obtenir une activité égale à la moitié de l'activité maximale. D'après les résultats ci-dessus la constante de dissociation apparente du complexe enzyme-PLP est $0,25 \cdot 10^{-5}M$ et celle du complexe enzyme-INHPLP est $0,20 \cdot 10^{-5}M$. Le fait que ces deux constantes soient sensiblement égales indique que le PLP et l'INHPLP ont des affinités voisines pour l'enzyme.

Tableau 12.

Action de l'INHPLP et de l'INH sur la TSase β_2

	activité (*) enzymatique	activation p. 100	inhibition p. 100
PLP $2 \cdot 10^{-4} M$	2000	100	
INHPLP $2 \cdot 10^{-4} M$	1880	94	
INHPLP $2 \cdot 10^{-4} M$	1550		
INHPLP $2 \cdot 10^{-4} M$ + INH $2 \cdot 10^{-4} M$	1280		17
INHPLP $2 \cdot 10^{-4} M$ + INH $2 \cdot 10^{-3} M$	1000		35
INHPLP $2 \cdot 10^{-4} M$ + INH $2 \cdot 10^{-2} M$	430		72

(*) L'activité enzymatique, exprimée en cpm, correspond au 1/3 de la quantité de L-tryptophane synthétisé en 30 mn à 37°C.

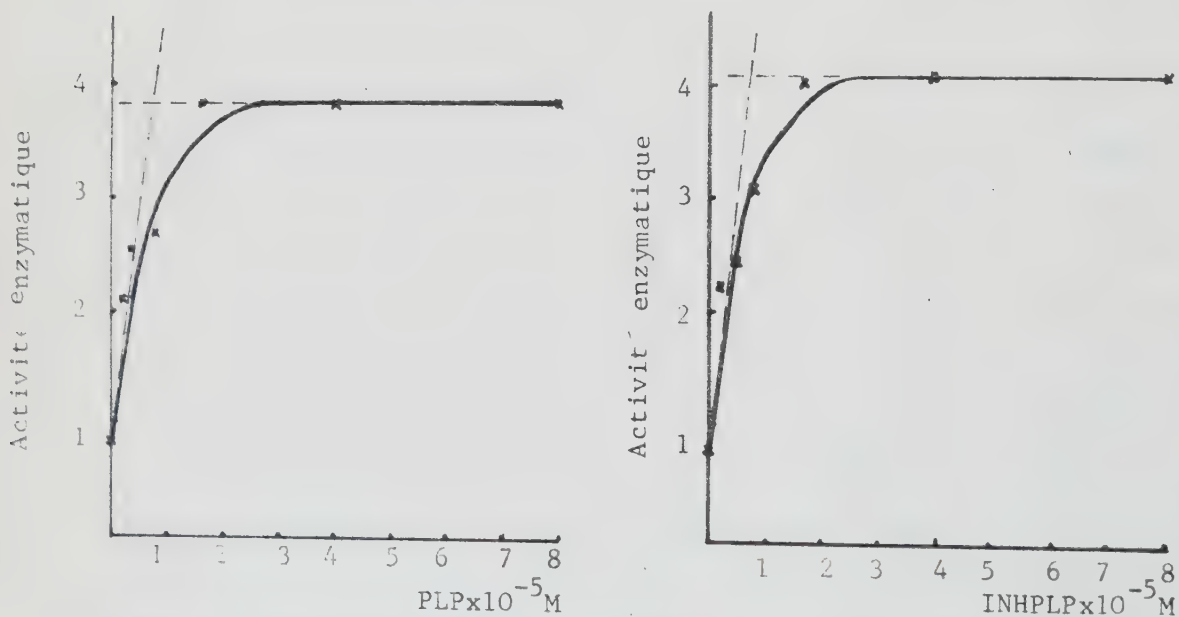


Fig. 16.- Action du PLP et de l'INHPLP sur la DOPA décarboxylase.

La préparation enzymatique est obtenue à partir de reins de lapin, elle correspond à l'étape I de la purification.
L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 15 mn à 37°C à pH 7,4, en présence de L-DOPA $3,2 \cdot 10^{-3} M$ et de 0,4 ml de préparation enzymatique par flacon de Warburg.

Ainsi le comportement de l'INHPLP vis-à-vis de la DOPA décarboxylase est tout-à-fait semblable à celui du PLP.

Action de l'INHPLP sur l'AAT.-

Gonnard et Nguyen-Philippon (64) ainsi que Murakami et Makino (102) ont montré que l'INHPLP est aussi active que le PLP vis-à-vis de l'AAT. Les mesures d'activité enzymatique qu'ils ont réalisées comprenaient une période d'incubation entre l'AAT et l'hydrazone allant jusqu'à 60 mn à 35°C. Il nous a paru intéressant d'examiner l'influence du temps d'incubation sur l'activité enzymatique.

Nous avons mis en contact l'apotransaminase et l'INHPLP à 20°C. Au cours de l'incubation nous avons prélevé dans le milieu des parties aliquotes et nous avons mesuré leur activité enzymatique. Nous avons effectué la même expérience avec du PLP.

Les courbes de la figure 17 représentent la vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction du temps d'incubation du PLP (courbe 1) et de l'INHPLP (courbe 2) avec l'apotransaminase.

Les deux courbes sont nettement différentes. En présence de PLP, la vitesse de réaction augmente rapidement et la vitesse maximale est atteinte en 20 mn. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Evangelopoulos (43). En présence d'INHPLP, la vitesse de réaction croît lentement et après 20 mn elle est seulement égale à 60 p. 100 de la vitesse maximale. Ce résultat indique que l'activation maximale de l'AAT ne peut être obtenue avec l'hydrazone qu'après une période d'incubation plus longue que celle nécessaire avec le PLP.

En conclusion, l'INHPLP est capable de remplacer le PLP dans les réactions catalysées par la tyrosine décarboxylase, la DOPA décarboxylase, la TSase β_2 , l'AAT. Dans le cas de la DOPA décarboxylase et de la TSase β_2 l'INHPLP se comporte d'une manière analogue à celle du PLP : son affinité pour l'enzyme et son efficacité en tant qu'activateur sont égales à celles du PLP.

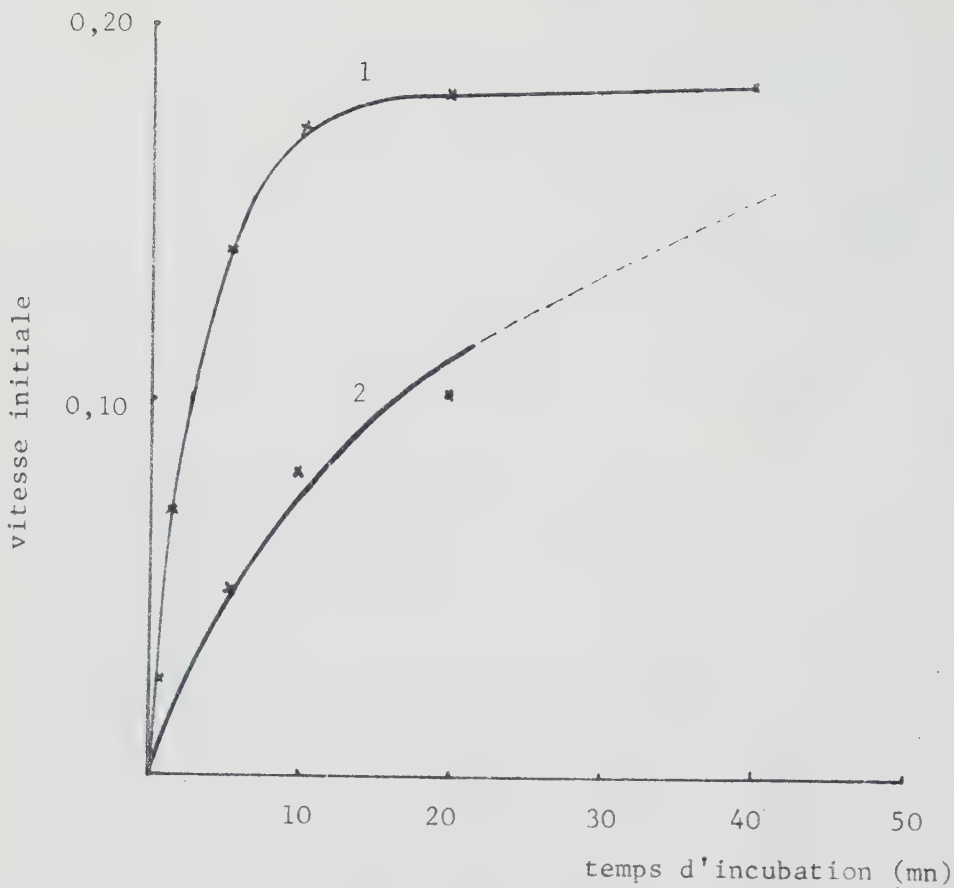


Fig. 17.- Action du PLP et de l'INHPLP sur l'AAT - influence du temps d'incubation.

incubation : elle est effectuée à 20°C en milieu tampon de phosphates $10^{-1}M$ pH 7,4 - apotransaminase : $3 \cdot 10^{-5}M$, PLP ou INHPLP : $20 \cdot 10^{-5}M$ -

dosage de l'activité enzymatique : il est réalisé selon la méthode indiquée au chapitre I - apotransaminase : $5 \cdot 10^{-8}M$, PLP (courbe 1) et INHPLP (courbe 2) : $33 \cdot 10^{-8}M$ -

CYANACETYLHYDRAZONE DE PLP

Gonnard et Duhault ont étudié les propriétés biochimiques et pharmacologiques du cyanacétylhydrazide et de l'hydrazone de PLP correspondante. L'hydrazide *in vitro*, à forte concentration, est un inhibiteur de la glutamate décarboxylase cérébrale et *in vivo* provoque l'apparition de crises convulsives chez l'animal. L'hydrazone, au contraire, active *in vitro* la glutamate décarboxylase cérébrale et n'a pas d'action *in vivo* (56).

Nous avons examiné les propriétés coenzymatiques de la cyanacétylhydrazone de PLP vis-à-vis de la DOPA décarboxylase en mesurant la décarboxylation enzymatique de la L-DOPA en présence de deux concentrations d'hydrazone :

$$0,4.10^{-5}M \text{ et } 4.10^{-5}M.$$

La première concentration est voisine de celle de PLP ($0,25.10^{-5}M$) qui produit une décarboxylation égale à la moitié de la décarboxylation maximale. La seconde concentration est supérieure à celle de PLP qui provoque la décarboxylation maximale ($0,7.10^{-5}M$ - voir action de l'INHPLP sur la DOPA décarboxylase).

Les mesures, ainsi effectuées, permettent d'estimer d'une part l'affinité de l'hydrazone pour l'enzyme et d'autre part son efficacité en tant qu'activateur de la réaction enzymatique.

D'après les résultats que nous avons obtenus (tableau 13), la cyanacétylhydrazone est, pour la DOPA décarboxylase, un coenzyme moins actif que le PLP : son affinité pour l'enzyme et son efficacité sont plus faibles que celles du coenzyme naturel.

SUCCINYLYHDRAZONE DE PLP

La succinylhydrazone de PLP est un composé aliphatique préparé à partir d'un dihydrazide : le dihydrazide succinique. Elle renferme deux restes phosphopyridoxaliques par molécule.

Nous avons étudié son action sur la DOPA décarboxylase dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'étude de la cyanacétylhydrazone de PLP.

Les résultats rassemblés dans le tableau 13 montrent que la succinylhydrazone de PLP se comporte vis-à-vis de la DOPA décarboxylase comme le PLP : son affinité pour l'enzyme et son activité catalytique semblent analogues à celles du coenzyme naturel.

La présence de deux restes phosphopyridoxaliques dans la molécule de succinylhydrazone ne lui confère pas de pouvoir coenzymatique particulier, même à faible concentration.

γ -GLUTAMYLHYDRAZONE DE PLP

Le γ -glutamylhydrazide et l'hydrazone de PLP correspondante ont été étudiées par Tapia et coll. vis-à-vis de la glutamate décarboxylase (93, 125, 126). Ces auteurs ont constaté que l'hydrazone a des actions opposées *in vitro* et *in vivo* :

in vitro : l'hydrazone active la glutamate décarboxylase au même degré que le PLP

in vivo : l'hydrazone ou des quantités équimoléculaires d'hydrazide et de PLP entraînent une diminution du taux d'acide γ -aminobutyrique cérébral. Les auteurs attribuent cette action à une inhibition de la pyridoxal kinase (126).

Quant au γ -glutamylhydrazide il inhibe la glutamate décarboxylase *in vitro* et *in vivo* (125).

Le γ -glutamylhydrazide présente la particularité d'avoir une structure analogue à celle du substrat de la réaction enzymatique qu'il inhibe. Cependant cette propriété structurale ne semble pas en liaison avec l'inhibition exercée car celle-ci est levée par une simple addition de PLP au milieu d'incubation (125).

Tableau 13.

Action d'hydrazidones de PLP sur la DOPA décarboxylase

	M/1	Activité (★) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	1,30	
	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,7	54
	$4 \cdot 10^{-5}$	3,9	100
Cyanacétylhydrazone de PLP	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,4	42
	$4 \cdot 10^{-5}$	3,4	81
PLP	0	1,05	
	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,65	63
	$4 \cdot 10^{-5}$	3,60	100
Succinylhydrazone de PLP	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,65	63
	$4 \cdot 10^{-5}$	3,65	100
PLP	0	0,75	
	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,20	64
	$4 \cdot 10^{-5}$	3	100
γ -glutamylhydrazone de PLP	$0,4 \cdot 10^{-5}$	1,35	27
	$4 \cdot 10^{-5}$	2,60	82
PLP	0	0,8	
	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,25	51
	$4 \cdot 10^{-5}$	3,65	100
Salicylhydrazone de PLP	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,4	56
	$4 \cdot 10^{-5}$	2,8	70

- Les préparations enzymatiques sont obtenues à partir de reins de lapin, elles correspondent à l'étape I de la purification (voir chapitre III).

(★) L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 15 mn à 37°C à pH 7,4 en présence de L-DOPA $3,2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ et d'un volume d'extrait enzymatique égal à 0,4 ml (succinylhydrazone), 0,6 ml (γ -glutamylhydrazone), 0,7 ml (salicylhydrazone et cyanacétylhydrazone) par fiole de Warburg.

Nous avons étudié l'action de la γ -glutamylhydrazone de PLP sur la DOPA décarboxylase dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'étude de la cyanacétylhydrazone de PLP.

Les résultats obtenus (tableau 13) indiquent que l'hydrazone active la décarboxylation enzymatique de la L-DOPA et que son affinité apparente pour l'enzyme est moindre que celle du PLP.

SALICYLHYDRAZONE DE PLP

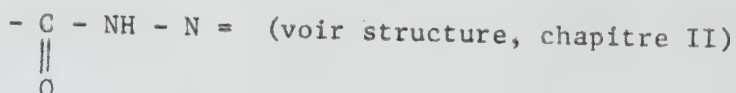
Cette hydrazidone de PLP possède un noyau aromatique qui porte en ortho par rapport à la chaîne hydrazidique un hydroxyle phénolique.

Nous avons étudié son action sur la DOPA décarboxylase dans des conditions analogues à celles utilisées pour l'étude de la cyanacétylhydrazone de PLP.

Les résultats donnés dans le tableau 13 indiquent que cette hydrazone active la DOPA décarboxylase et que son affinité apparente pour l'enzyme est analogue à celle du PLP.

SEMICARBAZONE DE PLP ET THIOSEMICARBAZONE DE PLP

La structure de ces deux composés, apparentés aux hydrazidones de PLP, est très voisine. La thiosemicarbazone ne diffère de la semicarbazone que par la présence, dans sa molécule, d'un atome de soufre à la place de l'atome d'oxygène du reste hydrazidique :



Gonnard et coll. (54) ont étudié l'action de ces dérivés du PLP sur différentes enzymes pyridoxaliques : glutamate décarboxylase, DOPA décarboxylase, tyrosine décarboxylase, cynurénine hydrolase et AAT.

Tableau 14.

Action de la semicarbazone et de la thiosemicarbazone de PLP
sur la DOPA décarboxylase

	M/l	Activité (★) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	0	
	$0,8 \cdot 10^{-5}$	2,70	82
	$8 \cdot 10^{-5}$	3,30	100
Semicarbazone de PLP	$0,64 \cdot 10^{-5}$	0,90	27
	$2,64 \cdot 10^{-5}$	1,45	44
	$6,4 \cdot 10^{-5}$	2,10	64
	$12,8 \cdot 10^{-5}$	2,75	83
Thiosemicarbazone de PLP	$0,6 \cdot 10^{-5}$	0,80	24
	$6,2 \cdot 10^{-5}$	1,05	32
	$12,5 \cdot 10^{-5}$	1,15	35
	$25 \cdot 10^{-5}$	1,35	41

- La préparation enzymatique est obtenue à partir de reins de porc,
elle correspond à l'étape II de la purification (chapitre III).

(★)

L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 60 mn
à 37°C à pH 7,4, en présence de L-DOPA $4 \cdot 10^{-3}\text{M}$ et d'un volume d'extrait
enzymatique égal à 0,2 ml par fiole de Warburg.

Tableau 15.

Action de la semicarbazone et de la thiosemicarbazone de PLP
sur la tyrosine décarboxylase

	M/l	Activité (*) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	0,4	
	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,86	65
	$0,8 \cdot 10^{-5}$	4,25	100
	$3,2 \cdot 10^{-5}$	4,25	100
	$8 \cdot 10^{-5}$	4,25	100
Semicarbazone de PLP	$0,8 \cdot 10^{-5}$	1,15	20
	$3,2 \cdot 10^{-5}$	3,05	69
	$8 \cdot 10^{-5}$	3,75	87
	$32 \cdot 10^{-5}$	4,15	97
Thiosemicarbazone de PLP	$0,8 \cdot 10^{-5}$	0,4	0
	$3,2 \cdot 10^{-5}$	1	16
	$8 \cdot 10^{-5}$	2,05	43
	$32 \cdot 10^{-5}$	3,9	91
	$40 \cdot 10^{-5}$	4,1	96

- La préparation enzymatique est une suspension à 1 p. 100 de poudre acétonique de *Streptococcus faecalis* (Sigma) dans du tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4. On utilise 0,5 ml de suspension par fiole de Warburg.

(*) L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 60 mn à 37°C en présence de L-tyrosine $2,2 \cdot 10^{-3}$ M et en milieu tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4

Leurs résultats, en accord avec ceux de Makino et coll. (92), ont montré que la semicarbazone active toutes les enzymes étudiées et que la thiosemicarbazone s'en différencie par son inactivité sur la cynurénine hydrolase.

Nous avons rassemblé dans les tableaux 14 et 15 les résultats que nous avons obtenus en faisant agir ces deux dérivés sur la DOPA décarboxylase et la tyrosine décarboxylase.

En ce qui concerne l'activation de la DOPA décarboxylase, nous constatons que la semicarbazone et surtout la thiosemicarbazone sont des catalyseurs peu efficaces : même aux concentrations élevées, la décarboxylation qu'ils produisent reste inférieure à celle obtenue en présence de faible quantité de PLP.

Il en est de même avec la tyrosine décarboxylase: pour obtenir sensiblement la même activation que celle produite par le PLP $0,8.10^{-5}M$ il faut atteindre des concentrations de semicarbazone et de thiosemicarbazone 40 à 50 fois plus fortes.

HYDRAZONE DE PLP ET AZINE DE PLP

L'hydrazone de PLP, obtenue en faisant réagir le PLP avec un excès d'hydrate d'hydrazine, renferme un seul reste phosphopyridoxalique et représente l'hydrazinone de PLP la plus simple. L'azine résulte de la réaction complète de l'hydrate d'hydrazine avec le PLP: elle possède deux restes phosphopyridoxaliques par molécule.

Makino et coll. ont étudié les propriétés coenzymatiques de ces deux dérivés et ont constaté que l'hydrazone active la glutamate décarboxylase et l'azine l'aspartate aminotransférase (92).

Nous avons mesuré la décarboxylation enzymatique de la L-DOPA en présence de ces deux composés à différentes concentrations. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 16.

Tableau 16.

Action de l'hydrazone de PLP et de l'azine de PLP sur la DOPA décarboxylase

	M/l	Activité (★) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	0,3	
	$1,6 \cdot 10^{-5}$	2,3	80
	$3,2 \cdot 10^{-5}$	2,8	100
	$8 \cdot 10^{-5}$	2,8	100
Hydrazone de PLP	$1,5 \cdot 10^{-5}$	2,2	76
	$3 \cdot 10^{-5}$	2,4	84
	$7,6 \cdot 10^{-5}$	3	108
Azine de PLP	$0,8 \cdot 10^{-5}$	2,6	92
	$1,6 \cdot 10^{-5}$	3,1	112
	$4 \cdot 10^{-5}$	3,4	124

- la préparation enzymatique est un extrait brut de reins de lapin au 1/20ème

(★)

L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 60 mn à 37°C à pH 7,4, en présence de L-DOPA $4 \cdot 10^{-3}\text{M}$ et d'un volume d'extrait enzymatique égal à 1,5 ml par fiole de Warburg.

Nous voyons que l'hydrazone se comporte sensiblement comme le PLP alors que l'azine est plus active que le coenzyme naturel.

D'après Curry et Bulen (35), en solution à pH 7 et à faible concentration (10^{-5} M), l'azine de PLP subit une hydrolyse partielle qui a pour effet de créer l'équilibre suivant :



Le PLP ainsi libéré pourrait être responsable de l'activité élevée de l'azine. En effet, Jencks et Cordes ont suggéré que le PLP lié sous forme d'imine représente une forme très réactive de coenzyme (78).

BENZYLHYDRAZONE DE PLP ET N-METHYLBENZYLHYDRAZONE DE PLP

Ces deux hydrazinones de PLP sont, au point de vue de la structure chimique, peu différentes: la seconde ne se distingue de la première que par la présence d'un groupe méthyle sur l'un des azotes hydraziniques.

Il nous a paru intéressant de connaître le comportement de ces deux dérivés très voisins vis-à-vis d'enzymes pyridoxaliques. Nous avons comparé leurs actions sur des décarboxylases: DOPA décarboxylase, 5-HTP décarboxylase et tyrosine décarboxylase (53).

Nous avons rassemblé dans les tableaux 17, 18, 19, les résultats les plus significatifs que nous ayons obtenus.

La benzylhydrazone de PLP active les décarboxylations enzymatiques de la L-DOPA, du 5-HTP et de la L-tyrosine. Son action est moins efficace que celle du PLP.

La N-méthylbenzylhydrazone de PLP active seulement la décarboxylation enzymatique de la L-tyrosine. Elle est pratiquement sans action sur la DOPA décarboxylase et semble même inhiber la 5-HTP décarboxylase.

Ainsi les deux hydrazones ont des actions différentes sur les enzymes étudiées.

Nous constatons que la N-méthylation modifie les propriétés coenzymatiques de la molécule initiale.

Tableau 17.

Action de la benzylhydrazone et de la N-méthylbenzylhydrazone de PLP
sur la DOPA décarboxylase

	M/l	activité (★) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	0,60	
	$0,8 \cdot 10^{-5}$	2,70	45
	$8 \cdot 10^{-5}$	5,25	100
	$32 \cdot 10^{-5}$	4,45	83
benzylhydrazone de PLP	$0,8 \cdot 10^{-5}$	2,10	32
	$3,2 \cdot 10^{-5}$	3,65	66
	$8 \cdot 10^{-5}$	4,10	75
	$32 \cdot 10^{-5}$	5,30	100
PLP	0	0	
	$32 \cdot 10^{-5}$	6	100
N-méthylbenzyl- hydrazone de PLP	$22 \cdot 10^{-5}$	0,3	5

- Les préparations enzymatiques sont obtenues à partir de rein de porc, elles correspondent à l'étape II de la purification (chapitre III).

(★)

L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 60 mn à 37°C à pH 7,4, en présence de L-DOPA $4 \cdot 10^{-3}\text{M}$ et d'un volume d'extrait enzymatique égal à 0,4 ml par fiole de Warburg.

Tableau 18.

Action de la benzylhydrazone et de la N-méthylbenzylhydrazone de PLP
sur la 5-HTP décarboxylase

	M/l	Activité (★) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	1,45	
	$0,8 \cdot 10^{-5}$	3,50	100
	$8 \cdot 10^{-5}$	3,25	88
	$32 \cdot 10^{-5}$	3	76
benzylhydrazone de PLP	$0,8 \cdot 10^{-5}$	2,95	73
	$3,2 \cdot 10^{-5}$	3,05	78
	$6,4 \cdot 10^{-5}$	2,80	66
	$32 \cdot 10^{-5}$	2,05	29
N-méthylbenzyl- hydrazone de PLP	$8 \cdot 10^{-5}$	0,35	-55
	$32 \cdot 10^{-5}$	0,30	-55

- La préparation enzymatique est obtenue à partir de reins de porc, elle correspond à l'étape II de la purification (chapitre III).

(★) L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 30 mn à 37°C à pH 7,4, en présence de 5-HTP $4 \cdot 10^{-3}\text{M}$ et d'un volume d'extrait enzymatique égal à 1,5 ml par fiole de Warburg.

Tableau 19.

Action de la benzylhydrazone et de la N-méthylbenzylhydrazone de PLP
sur la tyrosine décarboxylase

	M/l	Activité (*) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	0,6	
	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,10	41
	$0,8 \cdot 10^{-5}$	3,15	70
	$8 \cdot 10^{-5}$	4,00	93
	$32 \cdot 10^{-5}$	4,25	100
benzylhydrazone de PLP	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,90	63
	$0,8 \cdot 10^{-5}$	3,30	74
	$8 \cdot 10^{-5}$	2,70	58
	$32 \cdot 10^{-5}$	2,05	40
N-méthylbenzyl- hydrazone de PLP	$0,4 \cdot 10^{-5}$	0,6	0
	$0,8 \cdot 10^{-5}$	1,05	12
	$8 \cdot 10^{-5}$	2,95	64
	$32 \cdot 10^{-5}$	3,4	77

- La préparation enzymatique est une suspension à 1 p. 100 de poudre acétonique de *Streptococcus faecalis* (Sigma) dans du tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4. On utilise 0,5 ml de suspension par fiole de Warburg.

(*) L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 30 mn à 37°C en présence de L-tyrosine $2,2 \cdot 10^{-3}$ M et en milieu tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4.

En outre, nous avons étudié l'action de la benzylhydrazone de PLP sur l'AAT. Après avoir vérifié, dans une expérience préliminaire, que la benzylhydrazone activait l'apotransaminase, nous avons mesuré la vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction de la durée de l'incubation entre l'apoenzyme et l'hydrazone.

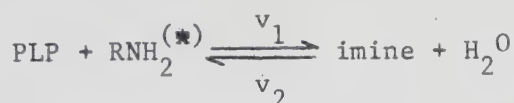
Nous avons mis en contact l'apotransaminase avec la benzylhydrazone à 20°C. Au cours de l'incubation nous avons prélevé dans le milieu des parties aliquotes et nous avons mesuré leur activité enzymatique. Nous avons effectué la même expérience avec du PLP.

Les courbes de la figure 18 représentent la vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction du temps d'incubation pour chaque effecteur: PLP (courbe 1) et hydrazone (courbe 2).

Les deux courbes sont différentes. En ce qui concerne le PLP, le résultat est identique à celui obtenu ^{/précédemment} (voir action du PLP et de l'INHPLP sur l'AAT). La vitesse maximale est atteinte en 20 mn. Quant à la benzylhydrazone de PLP elle se comporte comme l'INHPLP. Pour que l'activation qu'elle produit soit égale à celle du PLP il faut que le temps d'incubation dépasse 20 mn. Il est de l'ordre de 80 mn.

iodo-2 PHENYL IMINE DE PLP

Le PLP se combine aux amines primaires et aux acides aminés pour former des bases de Schiff ou imines qui existent en solution aqueuse neutre en équilibre avec leurs constituants (94) :



Les vitesses de formation et de dissociation des imines (v_1 et v_2) semblent rapides (98).

(*) RNH_2 : composé aminé.

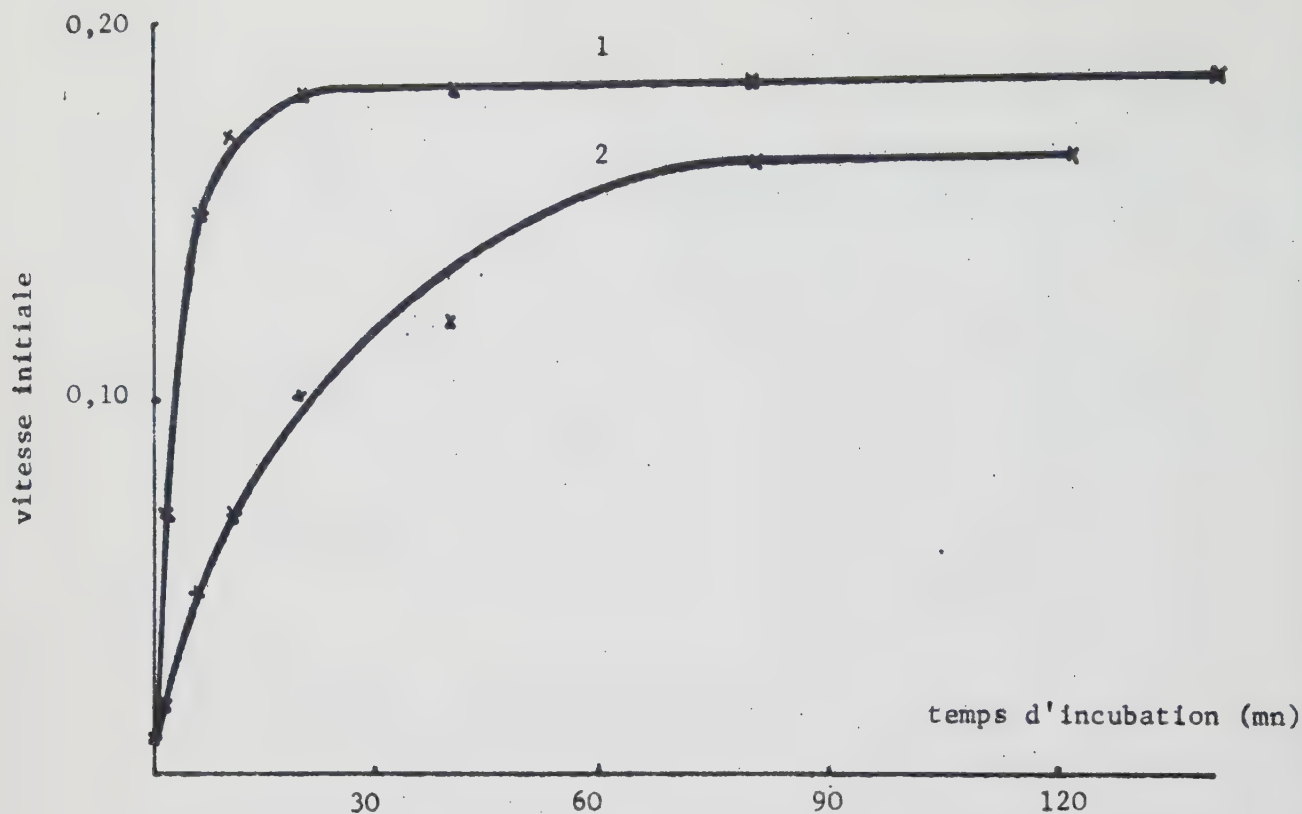


Fig. 18.- Action du PLP et de la benzylhydrazine de PLP sur l'AAT - influence du temps d'incubation -

incubation : elle est effectuée à 20°C en milieu tampon de phosphates 10^{-1} M pH 7,4 - apotransaminase : $3 \cdot 10^{-5}$ M, PLP ou benzylhydrazine de PLP : $20 \cdot 10^{-5}$ M

dosage de l'activité enzymatique : il est réalisé selon la méthode indiquée au chapitre I - apotransaminase : $5 \cdot 10^{-8}$ M, PLP (courbe 1) et benzylhydrazine de PLP (courbe 2) : $33 \cdot 10^{-8}$ M -

Nous avons étudié l'action de l'imine provenant de la combinaison du PLP avec o-iodaniline sur la DOPA décarboxylase et l'AAT.

Les expériences réalisées avec la DOPA décarboxylase ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles décrites à propos de l'étude de la cyanacétylhydrazone de PLP.

D'après les résultats réunis dans le tableau 20, on note que l'imine active la DOPA décarboxylase. Il semble même qu'à faible concentration son action soit plus efficace que celle du PLP. Ce résultat est à rapprocher de celui que nous avons obtenu avec l'azine de PLP.

Avec l'AAT, après avoir constaté, dans une expérience préliminaire que l'imine activait l'apotransaminase, nous avons étudié l'influence du temps d'incubation entre l'apoenzyme et l'imine sur l'activité enzymatique.

Nous avons mis en contact à 20°C de l'apotransaminase ($3,6 \cdot 10^{-5} \text{M}$) et de l'imine utilisée à deux concentrations ($20 \cdot 10^{-5} \text{M}$ et $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$). Au cours de l'incubation nous avons prélevé dans le milieu des parties aliquotes et nous avons mesuré leur activité enzymatique. Nous avons effectué les mêmes expériences avec du PLP.

Les courbes de la figure 19 représentent la vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction du temps d'incubation des 2 effecteurs.

On constate que l'imine se comporte exactement de la même manière que le PLP.

Avec une forte concentration d'imine ou de PLP ($20 \cdot 10^{-5} \text{M}$), on obtient la vitesse maximale de transamination après 20 mn d'incubation (courbes 1 et 2).

Avec une faible concentration d'imine ou de PLP ($2 \cdot 10^{-5} \text{M}$: concentration inférieure à celle de l'apoenzyme) on enregistre seulement une lente augmentation de la vitesse de transamination sans que la vitesse maximale soit atteinte (courbes 3 et 4). Ce résultat est dû, d'une part, à ce que le pourcentage d'activité obtenu, au bout d'un temps donné, est fonction de la concentration du coenzyme dans le milieu d'incubation (96) et d'autre part, à ce que l'activité maximale n'est atteinte qu'en présence de 2 molécules de PLP pour une molécule d'apoenzyme (43).

Tableau 20.

Action de l'iodo-2 phényl imine de PLP sur la DOPA décarboxylase

	M/l	Activité (★) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	0,90	
	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,45	60
	$4 \cdot 10^{-5}$	3,50	100
Iodo-2 phényl imine de PLP	$0,4 \cdot 10^{-5}$	3,05	83
	$4 \cdot 10^{-5}$	3,20	88

- La préparation enzymatique est obtenue à partir de reins de lapin, elle correspond à l'étape I de la purification (voir chapitre III).

(★)

L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 15 mn à 37°C à pH 7,4, en présence de L-DOPA $3,2 \cdot 10^{-3}$ M et d'un volume d'extrait enzymatique égal à 0,4 ml par fiole de Warburg.

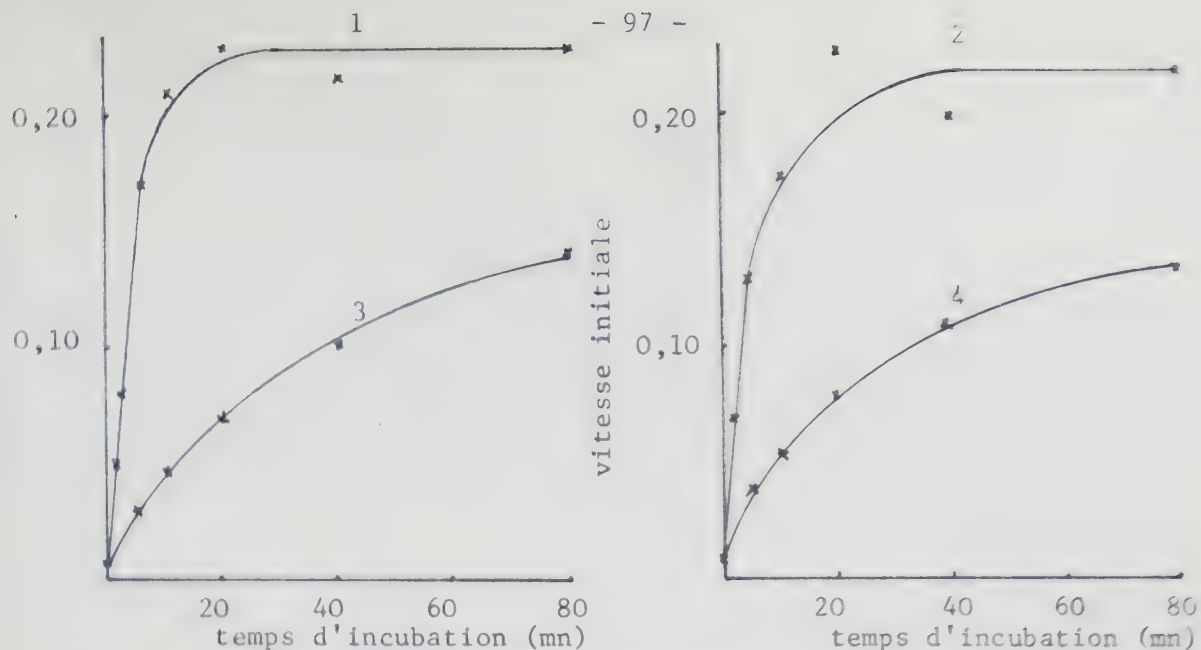


Fig. 19.- Action de l'iodo-2 phényl imine de PLP sur l'AAT -
influence du temps d'incubation

incubation : pH 7,4 - 20°C - apotransaminase $3,6 \cdot 10^{-5}$ M, PLP
et imine : $20 \cdot 10^{-5}$ M et $2 \cdot 10^{-5}$ M
dosage : apotransaminase : $6 \cdot 10^{-8}$ M, PLP (courbe 1) et imine
(courbe 2) : $33 \cdot 10^{-8}$ M, PLP (courbe 3) et imine (courbe 4) :
 $3,3 \cdot 10^{-8}$ M

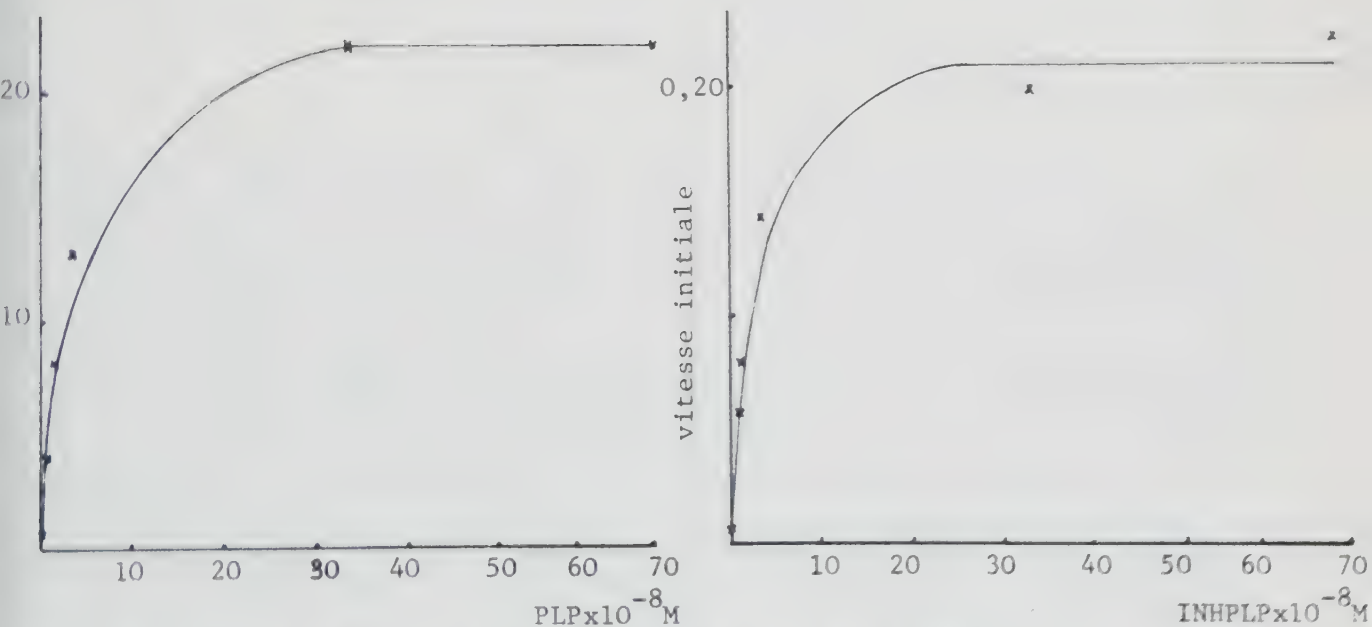


Fig. 20.- Action de l'iodo-2 phényl imine de PLP sur l'AAT -
influence de la concentration de l'effecteur

dosage : apotransaminase : $6 \cdot 10^{-8}$ M, temps d'incubation : 60 mn

Nous avons ensuite étudié l'influence de la concentration de l'imine dans le milieu de réaction sur l'activité enzymatique.

La préparation d'apotransaminase était préincubée avec de l'imine à différentes concentrations pendant 60 mn à 20°C puis son activité était mesurée. Des essais analogues étaient effectués avec du PLP.

Les courbes de la figure 20 représentent la vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction de la concentration de l'effecteur: PLP ou imine.

Les deux courbes sont identiques. A concentration égale l'imine active l'apotransaminase comme le PLP.

En conclusion, l'iodo-2 phényl imine de PLP agit sur la DOPA décarboxylase et l'AAT comme le PLP. Ce résultat indique qu'un dérivé du PLP qui, en solution, est en équilibre avec ses constituants et dont les vitesses de formation et de dissociation sont élevées, est capable de présenter une activité coenzymatique égale à celle du PLP.

TRIAZOLYL IMINE DE PLP

Ce composé obtenu en faisant réagir le PLP avec l'amino-4 triazole-1,2,4 possède une liaison imine qui l'apparente aux bases de Schiff. Comme celles-ci, il est probable qu'il se dissocie en solution. Nous avons, du reste, constaté qu'il subit une hydrolyse en milieu acide (chapitre II), ce qui le fait comparer à l'azine de PLP, composé complètement instable en milieu acide et à faible concentration (35).

Gonnard et coll. ont étudié son activité coenzymatique vis-à-vis de différentes enzymes. La glutamate décarboxylase, la DOPA décarboxylase, la cynurénine hydrolase et l'AAT sont activées par l'imine (57).

Nous donnons dans les tableaux 21, 22, 23, les résultats que nous avons obtenus (53, 57) en mesurant les décarboxylations enzymatiques de la L-DOPA, du 5-HTP et de la L-tyrosine en présence de triazolyl imine de PLP.

Tableau 21.

Action de la triazolyl imine de PLP sur la DOPA décarboxylase

	M/l	Activité (★) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	0,2	
	$0,8 \cdot 10^{-5}$	2,8	70
	$3,2 \cdot 10^{-5}$	3,7	94
	$8 \cdot 10^{-5}$	3,9	100
	$32 \cdot 10^{-5}$	2,7	68
Triazolyl imine de PLP	$0,64 \cdot 10^{-5}$	2,7	68
	$2,56 \cdot 10^{-5}$	3,6	92
	$6,4 \cdot 10^{-5}$	4,2	108
	$12,8 \cdot 10^{-5}$	4,4	113
	$25,6 \cdot 10^{-5}$	4,4	113

- La préparation enzymatique est un extrait brut de reins de lapin au 1/20ème

(★)

L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 60 mn à 37°C à pH 7,4, en présence de L-DOPA $4 \cdot 10^{-3}$ M et d'un volume d'extrait enzymatique égal à 1,5 ml par fiole de Warburg.

Tableau 22.

Action de la triazolyl imine de PLP sur la 5-HTP décarboxylase			
	M/1	Activité (★) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	2,15	
	$0,8 \cdot 10^{-5}$	4	100
	$8 \cdot 10^{-5}$	3,55	75
	$32 \cdot 10^{-5}$	2,8	35
Triazolyl imine de PLP	$0,8 \cdot 10^{-5}$	3,25	60
	$3,2 \cdot 10^{-5}$	3,55	75
	$8 \cdot 10^{-5}$	3,60	79
	$32 \cdot 10^{-5}$	3,30	62

- La préparation enzymatique est obtenue à partir de reins de porc, elle correspond à l'étape II de la purification (chapitre III).

(★)

L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 30 mn à 37°C à pH 7,4, en présence de 5-HTP $4 \cdot 10^{-3}\text{M}$ et d'un volume d'extrait enzymatique égal à 1,5 ml par fiole de Warburg.

Tableau 23.

Action de la triazolyl imine de PLP sur la tyrosine décarboxylase

	M/l	Activité (*) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	0,6	
	$0,8 \cdot 10^{-5}$	3,55	78
	$32 \cdot 10^{-5}$	4,40	100
Triazolyl imine de PLP	$0,8 \cdot 10^{-5}$	3,05	65
	$3,2 \cdot 10^{-5}$	3,95	88
	$8 \cdot 10^{-5}$	4	89
	$32 \cdot 10^{-5}$	4	89

- La préparation enzymatique est une suspension à 1 p. 100 de poudre acétonique de *Streptococcus faecalis* (Sigma) dans du tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4. On utilise 0,5 ml de suspension par fiole de Warburg.

(*) L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 30 mn à 37°C, en présence de L-tyrosine $2,2 \cdot 10^{-3}$ M et en milieu tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4.

L'imine augmente la décarboxylation enzymatique des trois acides aminés étudiés. Dans le cas de la L-DOPA on constate que son activité est légèrement supérieure à celle du PLP et qu'elle reste constante aux fortes concentrations alors que celle du PLP diminue. W.G. Clark et coll. ont observé le même phénomène en faisant agir cette imine sur l'histidine décarboxylase (31).

OXIME DE PLP

Makino et coll. ont étudié l'activité coenzymatique de l'oxime de PLP vis-à-vis de la glutamate décarboxylase et de l'AAT. Ils ont constaté que ce dérivé du PLP est sans action sur la décarboxylase et que, au contraire, il active la transaminase (92). Ces résultats ont été confirmés par Gonnard et coll. (54).

Nous avons réuni dans les tableaux 24, 25, 26, les résultats que nous avons obtenus en faisant agir l'oxime de PLP sur les trois décarboxylases suivantes ; DOPA décarboxylase, 5-HTP décarboxylase et tyrosine décarboxylase (53, 54).

L'oxime n'active pratiquement pas la décarboxylation enzymatique de la L-DOPA. Elle a même une action inhibitrice sur la DOPA décarboxylase (tableau 24). En supposant que l'oxime se fixe sur cette enzyme, comme elle le fait avec l'AAT (102), on peut concevoir qu'une compétition a lieu au niveau des sites actifs entre le PLP et l'oxime.

L'oxime est sans action sur la 5-HTP décarboxylase.

L'oxime est un activateur médiocre de la tyrosine décarboxylase. Une activation de l'ordre de 70 à 80 p. 100 de celle obtenue avec le PLP est atteinte seulement avec des concentrations élevées d'oxime.

Tableau 24.

Action de l'oxime de PLP sur la DOPA décarboxylase

<u>PLP</u> M/l	<u>Oxime de PLP</u> M/l	Activité (★) enzymatique	Activation p. 100
0	0	1,05	
8.10^{-5}	0	8,35	100
0	8.10^{-5}	2,05	14
8.10^{-5}	8.10^{-5}	5,05	55

- La préparation enzymatique est un extrait brut de reins de porc au 1/20ème

(★) L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 60 mn à 37°C à pH 7,4, en présence de L-DOPA $4.10^{-3}M$ et d'un volume d'extrait enzymatique égal à 1,5 ml par fiole de Warburg.

Tableau 25.

Action de l'oxime de PLP sur la 5-HTP décarboxylase

<u>PLP</u> M/l	<u>Oxime de PLP</u> M/l	Activité (★) enzymatique	Activation p. 100
0	0	1,05	
8.10^{-5}	0	2,05	100
0	8.10^{-5}	1	0
8.10^{-5}	8.10^{-5}	1,9	85

- La préparation enzymatique est obtenue à partir de reins de porc, elle correspond à l'étape II de la purification (chapitre III).

(★) L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 30 mn à 37°C à pH 7,4, en présence de 5 HTP $4.10^{-3}M$ et d'un volume d'extrait enzymatique égal à 1 ml par fiole de Warburg.

Tableau 26.

Action de l'oxime de PLP sur la tyrosine décarboxylase

	M/l	Activité (★) enzymatique	Activation p. 100
PLP	0	0,50	
	$0,4 \cdot 10^{-5}$	2,85	63
	$0,8 \cdot 10^{-5}$	4,25	100
	$3,2 \cdot 10^{-5}$	4,25	100
	$8 \cdot 10^{-5}$	4,25	100
Oxime de PLP	$8 \cdot 10^{-5}$	1,35	23
	$32 \cdot 10^{-5}$	3,40	77
	$40 \cdot 10^{-5}$	3,20	72

- La préparation enzymatique est une suspension à 1 p. 100 de poudre acétonique de *Streptococcus faecalis* (Sigma) dans du tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4. On utilise 0,5 ml de suspension par fiole de Warburg.

(★) L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de CO_2 dégagé en 60 mn à 37°C , en présence de L-tyrosine $2,2 \cdot 10^{-3}$ M et en milieu tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4.

L'étude de l'action des dérivés du PLP sur les pyridoxalo-enzymes permet de constater les faits suivants :

- Tous les dérivés étudiés possèdent une action coenzymatique. Ils sont plus ou moins capables de remplacer le coenzyme naturel et ils peuvent activer une ou plusieurs enzymes.

- Un dérivé qui agit sur plusieurs enzymes peut avoir une action coenzymatique plus ou moins marquée selon l'enzyme considérée. Ainsi, l'INHPLP et la benzylhydrazone de PLP sont tantôt aussi actives tantôt moins efficaces que le PLP. Dans certains cas, le dérivé se comporte de manière très différente avec les diverses enzymes. Ainsi, l'oxime de PLP qui active l'AAT est sans action sur la glutamate décarboxylase et inhibe la DOPA décarboxylase. Ce comportement se retrouve avec la N-méthylbenzylhydrazone de PLP et avec deux autres dérivés du PLP: l'hydrazone de l' α -méthylhydrazino DOPA et la trihydroxy-2,3,4 benzylhydrazone qui activent la glutamate décarboxylase et la tyrosine décarboxylase, alors qu'ils inhibent la DOPA décarboxylase et la 5-HTP décarboxylase (58, 59).

- Les actions de différents dérivés sur une même enzyme ne sont pas forcément identiques. Considérons, par exemple, le cas de la DOPA décarboxylase. L'INHPLP l'active autant que le PLP; la benzylhydrazone de PLP l'active moins; la N-méthylbenzylhydrazone de PLP n'a pas d'action sur elle et l'oxime de PLP l'inhibe.

- Une parenté de structure entre deux dérivés ne s'accompagne pas nécessairement d'une identité d'action. La benzylhydrazone de PLP et la N-méthylbenzylhydrazone de PLP en sont une preuve.

- Quand une préincubation doit avoir lieu entre le coenzyme et l'apoenzyme pour que l'activité maximale soit obtenue, sa durée est plus longue avec les hydrazones qu'avec le PLP (cas de l'INHPLP et de la benzylhydrazone de PLP avec l'AAT). Par contre la période d'incubation de l'iodo-2 phényl imine de PLP est la même que celle du PLP.

- Parmi les dérivés étudiés, ceux qui existent, en solution aqueuse, en équilibre avec leurs constituants manifestent toujours une activité coenzymatique au moins égale à celle du PLP. Il en est ainsi pour l'azine de PLP et les imines d'o-iodaniline et d'aminotriazole.

Les faits expérimentaux les plus significatifs que nous venons de rassembler permettent de tirer quelques conclusions concernant le mode d'action des dérivés du PLP.

Nous avons pu constater que les *imines de PLP* et *l'azine de PLP* activent toutes les enzymes étudiées. Nous savons que ces composés sont instables et qu'ils existent, en solution, en équilibre, avec leurs constituants. Par conséquent, il est probable que leur action coenzymatique est due au PLP régénéré.

Le fait que ces dérivés présentent une activité coenzymatique égale et même parfois supérieure à celle du PLP suggère qu'il suffit aux dérivés du PLP d'être instables pour posséder des propriétés coenzymatiques.

En ce qui concerne les *hydrazones de PLP*, nous avons pu constater que leur comportement, au contraire de celui des imines, est très varié. Cela peut-il être interprété comme une conséquence de leur action propre ? nous ne le pensons pas. Le fait qu'une hydrazone de PLP agisse différemment sur divers enzymes ne prouve pas qu'elle soit stable et qu'elle agisse par elle-même. De même, le fait qu'une hydrazone de PLP active une enzyme alors que l'hydrazide correspondant l'inhibe (cas de l'INHPLP et de l'INH) ne signifie pas non plus qu'elle soit stable. Les propriétés inhibitrices de l'hydrazide apparaissent en effet à des concentrations plus élevées que celles utilisées avec les hydrazones.

En conclusion, *l'étude de l'action des hydrazones de PLP sur les pyridoxalo-enzymes permet d'affirmer que ces dérivés peuvent remplacer le PLP en tant que coenzyme* mais ne fournit pas de données sur leur mécanisme d'action qui reste à élucider.

Chapitre V

ETUDE DU MECANISME D'ACTION DES DERIVES DU PLP

Les dérivés du PLP ont un rôle coenzymatique incontestable. Cependant ils ne possèdent pas de fonction aldéhyde libre et par conséquent ils ne peuvent pas se combiner à l'acide aminé substrat comme le fait le PLP (24, 99). Ils semblent donc exercer leur activité coenzymatique par un mécanisme différent de celui du PLP à moins qu'en se dissociant au cours de la catalyse enzymatique ils ne régénèrent le PLP. Ainsi étudier le mécanisme d'action des dérivés du PLP consiste, en premier lieu, à étudier leur stabilité en particulier en présence d'enzyme: ou bien ils sont stables et agissent par eux-mêmes ou bien ils sont instables et doivent leur activité au PLP qu'ils libèrent.

P. GONNARD ayant rassemblé un certain nombre d'arguments en faveur de l'action propre des dérivés du PLP (51), nous avons abordé l'étude de leur mécanisme d'action en réalisant des expériences qui devaient mettre en évidence leur stabilité en présence d'enzyme.

Nous avons d'abord étudié la stabilité de l'INHPLP en présence d'AAT et de glutamate décarboxylase, puis celle de la benzylhydrazone de PLP marquée au ^{14}C en présence d'AAT, de glutamate décarboxylase et de DOPA décarboxylase. Les conditions de pH, de température et de force ionique étaient les mêmes que celles rencontrées dans les mesures d'activité enzymatique mais les milieux ne renfermaient pas de substrat. Dans les deux

cas, les hydrazones se montrèrent stables. Nous n'avions décelé ni PLP ni hydrazide dans les milieux d'incubation (55, 66).

Devant ces résultats, nous avons commencé l'étude de la fixation des hydrazones de PLP sur les enzymes. Pour réaliser cette étude, nous avons été amenée à filtrer sur des colonnes de gel de sephadex des préparations enzymatiques incubées avec de l'INHPLP. Or les éluats obtenus après filtration contenaient en plus ou moins grande quantité, selon les conditions d'incubation, de l'hydrazide isonicotinique. La filtration sur gel de sephadex avait révélé la dissociation de l'INHPLP en solution.

Nous reprîmes donc l'étude de la stabilité des hydrazones de PLP. Pour mettre en évidence leur dissociation, nous avons dû parfois nous écarter des conditions expérimentales utilisées dans les réactions enzymatiques. L'important était de faire apparaître un phénomène qui reste toujours discret mais qui néanmoins semble essentiel au point de vue du mécanisme d'action des hydrazones de PLP.

Pour cette étude, nous avons utilisé l'INHPLP et la benzylhydrazone de PLP. Nous avons choisi ces dérivés car ils manifestent des propriétés coenzymatiques vis-à-vis de plusieurs enzymes pyridoxaliques (voir chapitre IV). En outre, ils représentent les deux classes d'hydrazones: les hydrazidones (INHPLP) et les hydrazinones (benzylhydrazone).

Avant d'exposer nos expériences sur le mécanisme d'action des hydrazones de PLP, nous citerons les travaux qui traitent de ce sujet.

Fujioka et Snell ont étudié l'oxime, l'hydrazone, la semicarbazone et l'isonicotylhydrazone de *pyridoxal* en tant que *substrats* de la transaminase pyridoxamine-pyruvate. Ils ont constaté que ces dérivés se fixent sur l'enzyme que leurs affinités sont voisines de celles du pyridoxal et de la pyridoxamine mais que leurs transaminations sont très faibles. Ils ont observé que le complexe "enzyme-pyridoxal" se forme à partir des dérivés et de l'enzyme. De ces résultats ils ont déduit que l'activité coenzymatique des dérivés du PLP est due à leur "interaction avec l'apoenzyme pour donner du PLP lié à l'enzyme" (45). Notons que pour arriver à cette conclusion les auteurs ont supposé que les dérivés du PLP réagissent comme ceux du pyridoxal.

Torchinsky, quant à lui, a étudié le comportement d'un dérivé du *PLP*: l'*INHPLP*, en présence d'aspartate transaminase (127). Il a constaté que le spectre de l'apoenzyme incubée avec l'*INHPLP* varie au cours de l'incubation pour finalement devenir identique à celui de l'enzyme-*PLP*. Il en a déduit que l'hydrazone se fixe sur l'apoenzyme et subit une scission subséquente qui donne naissance à de l'holoenzyme. Il semble difficile de tirer une conclusion sur le mode d'action des dérivés du *PLP* à partir de cette étude car l'incubation entre l'*INHPLP* et l'*AAT* a été effectuée en milieu acide: pH 4,6 alors que la catalyse exercée par l'*AAT* a lieu à pH 7,4.

Murakami et Makino ont également étudié le comportement d'un dérivé du *PLP*: l'oxime, en présence d'*AAT*. Ils ont constaté que ce dérivé se fixe sur l'enzyme et que, aux faibles concentrations en enzyme, il est décomposé après la réaction enzymatique. Les expériences qu'ils ont réalisées ont été effectuées dans les conditions où s'exerce l'activité enzymatique. Mais ces auteurs ont été incapables de démontrer que la dissociation de l'oxime est responsable de son activité coenzymatique (102).

Nous décrirons d'abord les essais que nous avons effectués en l'absence d'enzyme (1ère partie) puis ceux réalisés en présence d'enzyme seule ou additionnée de substrat (2ème partie) ensuite nous exposerons les expériences qui ont permis d'étudier le rôle de l'enzyme dans la dissociation des hydrazones (3ème partie) et celui des acides aminés substrats (4ème partie).

I^{ère} Partie - STABILITE DES HYDRAZONES DE PLP EN SOLUTION AQUEUSE NEUTRE
ET EN L'ABSENCE DE PREPARATION ENZYMATIQUE

a) Recherche de l'INH dans une solution d'INHPLP - influence de la température -

Nous avons recherché l'INH dans une solution d'INHPLP maintenue pendant 60 mn à 37°C. L'hydrazone était dissoute dans la solution tampon de tris 5.10^{-2} M pH 7,4.

Nous avons détecté l'INH dans la solution d'hydrazone par filtration sur gel de sephadex G-10. Les filtrations étaient réalisées avec la solution tampon de tris 5.10^{-2} M pH 7,4. (technique décrite au chapitre I).

Nous avons effectué un essai témoin en filtrant sur gel de sephadex G-10 la solution d'hydrazone immédiatement après sa préparation et avant son séjour à 37°C.

La quantité d'INHPLP filtrée était égale à 0,5 μ mole (dépôt: 0,8 ml de solution $0,62.10^{-3}$ M).

Nous avons dosé dans l'éluat une quantité d'INH correspondant à une dissociation de l'hydrazone de l'ordre de:

2 à 5 p. 100 avant séjour de la solution à 37°C

10 à 15 p. 100 après séjour de la solution à 37°C

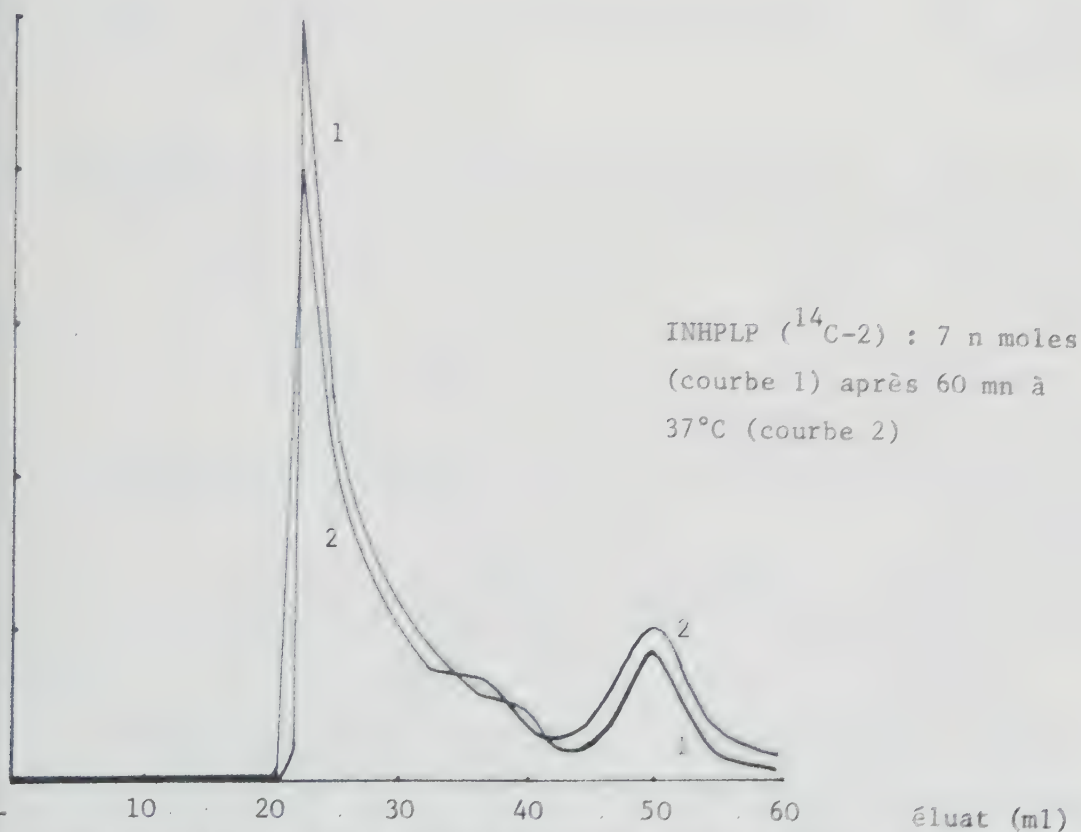
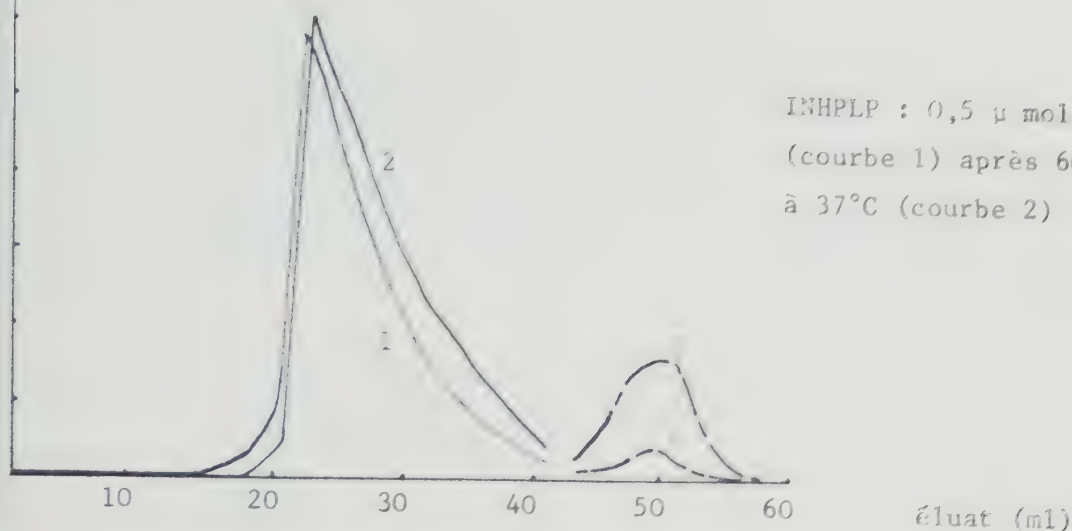
Les diagrammes d'élution sont représentés sur la figure 21.

Le dosage de l'INH était effectué par la méthode à l'o.phénanthroline-Fe⁺⁺⁺ décrite au chapitre I.

Pour obtenir le pourcentage d'hydrazone dissociée avec plus de précision, nous avons répété ces expériences avec de l'INHPLP marquée au ¹⁴C dans la partie hydrazidique de la molécule.

D.O. λ 295 nm ——— - 111 -

λ 510 nm - - - - -



Filtration d'INHPLP sur gel de sephadex G-10 en tampon de tris $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$
pH 7,4 -

colonne : hauteur du gel = 56 cm, diamètre de la colonne = 1 cm, débit
de l'éluat = 12 ml/h

volumes d'élution (V_e) : V_e INHPLP = 23 ml, V_e INH = 50 ml

Nous avons filtré 7 n moles d'hydrazone marquée (100 μ l d'une solution 7.10^{-5} M en tampon tris 5.10^{-2} M pH 7,4) puis mesuré la radioactivité des fractions recueillies à l'aide du liquide scintillant formule A (voir chapitre I).

La radioactivité au niveau du pic d'INH représentait 6 p. 100 de la radioactivité totale avant séjour de la solution d'hydrazone à 37°C et 11 p. 100 après 60 mn à 37°C (fig. 21).

Nous avons ainsi constaté qu'en augmentant la température d'une solution d'INHPLP, une petite quantité d'INH libre apparaissait dans le milieu.

En outre, la présence d'INH dans l'éluat obtenu en filtrant l'INHPLP avant séjour à 37°C indiquait qu'une hydrolyse légère avait lieu pendant la filtration.

b) Recherche du PLP dans une solution d'INHPLP - influence du temps d'incubation -

Nous avons recherché le PLP susceptible d'apparaître dans une solution d'INHPLP conservée pendant 48 h à la température du laboratoire. L'hydrazone était en solution 2.10^{-3} M dans du tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4 .

Le PLP a été détecté dans la solution d'hydrazone par chromatographie en couche mince (technique décrite au chapitre I).

Nous avons effectué les chromatographies dans les conditions suivantes:

support : couche mince de cellulose

phase mobile : tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4.

L'emploi de la solution tampon de phosphates présentait l'avantage sur les solvants organiques courants de permettre la réalisation de la séparation chromatographique dans des conditions de pH et de force ionique analogues à celles utilisées dans les mesures d'activité enzymatiques. Le PLP ($R_f = 0,95$) était bien séparé de l'INHPLP ($R_f = 0,65$).

Nous avons chromatographié 5 et 10 μg d'INHPLP (dépot : 6,8 et 13,6 μl de solution 2.10^{-3}M) et nous avons caractérisé le PLP, après développement chromatographique, à l'aide du réactif de Gibbs. L'intensité de la coloration de la tache nous a permis d'apprécier la quantité de PLP présente.

Au moment de la mise en solution de l'INHPLP, la quantité de PLP détectée correspondait à une hydrolyse de l'ordre de 2 p. 100; après 24 heures elle augmentait et représentait une hydrolyse comprise entre 2 et 10 p. 100. Après 48 heures l'hydrolyse était voisine de 10 p. 100. La solution d'hydrazone était conservée à la température du laboratoire et à l'obscurité.

Ces résultats indiquaient que, dans une solution d'INHPLP maintenue à une température de 20°C , du PLP apparaissait lentement.

En outre, nous avons constaté une légère hydrolyse de l'INHPLP au cours de la séparation chromatographique. En effet, après avoir effectué une première migration, nous avons réalisé une deuxième migration dans une direction perpendiculaire à la première et nous avons observé que du PLP apparaissait à nouveau.

c) Influence de la concentration de l'INHPLP sur sa propre dissociation -

D'après les expériences précédentes, l'INHPLP se dissocie en solution. Si il existe un équilibre de dissociation du type



cet équilibre doit être déplacé par changement de la concentration initiale de l'INHPLP. Ceci a été étudié en réalisant des filtrations sur gel de sephadex G-10 de solutions d'INHPLP de concentrations différentes. L'hydrazone était dissoute dans la solution tampon de phosphates 5.10^{-2}M pH 7,4. Les filtrations étaient effectuées avec la même solution tampon.

1ère filtration - Nous avons filtré une solution d'INHPLP 1.10^{-3}M . Le volume de solution utilisé était égal à 0,5 ml, soit une quantité d'INHPLP de 0,5 μmole .

2ème filtration - Nous avons utilisé de l'hydrazone marquée au ^{14}C dans sa partie hydrazidique. La concentration de la solution était alors beaucoup plus faible: $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Nous avons filtré 5 n moles d'INHPLP radioactive (dépôt: 0,2 ml de solution) puis nous avons mesuré la radioactivité des fractions recueillies à l'aide du liquide scintillant formule B (voir chapitre I).

3ème filtration - Nous avons préparé une solution mixte d'INHPLP non marquée et d'INHPLP marquée. Cette solution renfermait $2,5 \cdot 10^{-3}$ molécule d'hydrazone non radioactive et $2,5 \cdot 10^{-5}$ molécule d'hydrazone marquée par litre. Nous avons déposé 0,2 ml de cette solution sur une colonne de gel de sephadex G-10, soit 0,5 μ mole d'INHPLP non marquée et 5 n moles d'INHPLP marquée.

Nous avons obtenu les résultats suivants (fig. 22)

- Après la filtration (1) nous n'avons pas décelé d'hydrazide dans l'éluat. L'hydrazide était détecté en mesurant la densité optique des fractions à 260 nm. Dans les conditions expérimentales choisies, la quantité minimale révélée était de l'ordre de 0,125 μ moles. Donc on peut dire que l'hydrolyse était inférieure à 25 p. 100.

- Après la filtration (2) le diagramme d'élution présentait un seul pic de radioactivité correspondant à de l'INH. L'hydrolyse était totale.

- Après la filtration (3), il apparaissait sur le diagramme d'élution un seul pic de radioactivité correspondant à de l'INHPLP. Un plateau, peu important, précédait le pic, il se situait au niveau de l'INH mais il était difficile d'apprécier la quantité d'INH qu'il représentait. L'hydrolyse était faible.

Ces résultats indiquent que l'INHPLP se dissocie, au cours de la filtration, en fonction de sa concentration initiale.

Si la concentration initiale est de l'ordre de 10^{-3} M , la dissociation de l'hydrazone, dans les conditions expérimentales utilisées, est peu importante,

cpm D.O.

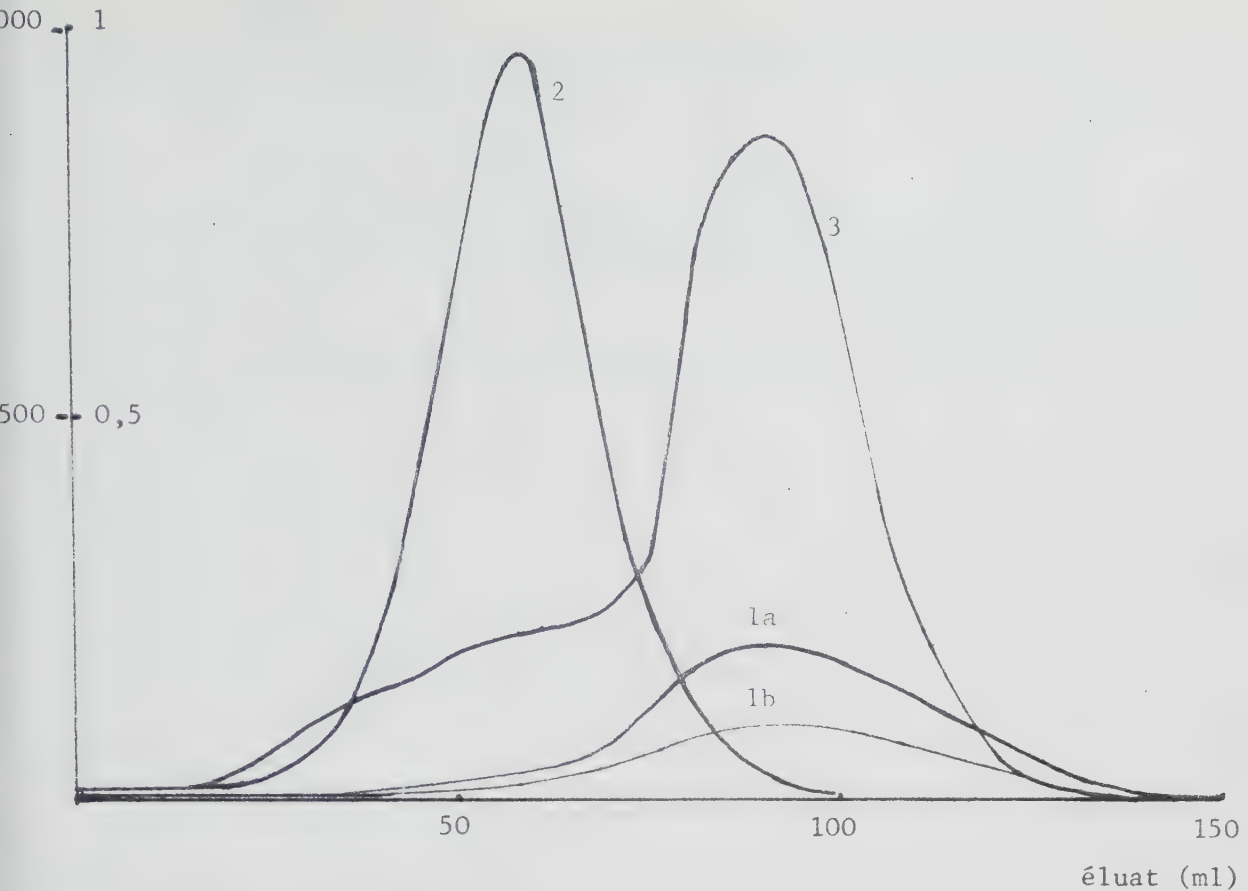


Fig. 22.- Filtration d'INHPLP sur gel de sephadex G-10 en tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4 -

colonne : hauteur du gel = 56 cm, diamètre de la colonne = 1 cm, débit de l'éluat = 12 ml/h, volume d'une fraction = 1 ml

volumes d'élution (V_e) : V_e INHPLP = 90 ml, V_e INH = 58 ml

1ère filtration : INHPLP $1 \cdot 10^{-3}$ M (courbe 1a : D.O. λ 295 nm, courbe 1b : D.O. λ 260 nm)

2ème filtration : INHPLP (^{14}C -2) $2,5 \cdot 10^{-5}$ M (courbe 2)

3ème filtration : INHPLP $2,5 \cdot 10^{-3}$ M et INHPLP (^{14}C -2) $2,5 \cdot 10^{-5}$ M (courbe 3).

si la concentration initiale est de l'ordre de 10^{-5} M, la dissociation de l'hydrazone, dans les conditions expérimentales utilisées, est très importante.

De plus, si l'on compare ces résultats à ceux que nous avons obtenus en réalisant des filtrations en solution tampon de tris (paragraphe a), nous constatons que:

- le volume d'élution (V_e) de l'hydrazone varie avec le tampon utilisé:

V_e INHPLP = 23 ml en tampon de tris 5.10^{-2} M pH 7,4

V_e INHPLP = 90 ml en tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4

l'hydrazone, en milieu tampon de phosphates, est retenue par le gel;

- la dissociation de l'hydrazone varie avec le tampon utilisé:

dissociation de l'INHPLP (7.10^{-5} M) = 6 p. 100 en tampon de tris 5.10^{-2} M pH 7,4

dissociation de l'INHPLP ($2,5.10^{-5}$ M) = 100 p. 100 en tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4.

Ainsi la nature de la solution tampon utilisée pour réaliser la filtration a une influence à la fois sur l'élution et sur la dissociation de l'hydrazone. Il ne s'agit pas du reste d'une simple filtration puisque le volume d'élution de l'hydrazone dépend pas uniquement de la taille de la molécule.

Cette expérience confirme l'existence de la dissociation de l'hydrazone et indique qu'un équilibre entre INHPLP, PLP et INH est possible en solution.

d) Mise en évidence de l'équilibre : INHPLP, PLP, INH -

Nous avons mis en évidence l'équilibre qui existe entre l'INHPLP, le PLP et l'INH en réalisant l'expérience suivante.

Nous avons mis en contact de l'INHPLP marquée au 14 C, dans la partie hydrazidique de la molécule, avec un excès d'INH non radioactif: 10 fois, 100 fois, 1000 fois plus d'hydrazide que d'hydrazone. Ensuite,

en fonction du temps d'incubation, nous avons mesuré la radioactivité de l'hydrazone et de l'hydrazide présents dans le milieu.

Chaque expérience peut être décomposée en trois parties.

1) Incubation - On prépare, au moment de l'expérience, une solution 10^{-4} molaire d'INHPLP marquée en tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4, renfermant de l'INH non radioactif. La concentration de l'INH dans le milieu est selon les expériences égale à : 10^{-3} M, 10^{-2} M, 10^{-1} M. L'incubation est effectuée à 20°C. Au bout de 10, 20, 40, 80, et 160 mn, on préleve des parties aliquotes que l'on traite par le BH_4Na . L'addition de BH_4Na au milieu a pour but de réduire l'hydrazone (124) et d'éviter ainsi qu'une dissociation ultérieure ne se produise. Ensuite on ajoute une goutte d'acide acétique pur de manière à détruire l'excès de BH_4Na . Le pH qui avait augmenté au moment de l'addition du BH_4Na devient alors sensiblement égal à 6.

2) Séparation de l'INHPLP et de l'INH - L'hydrazone est séparée de l'hydrazide par chromatographie en couche mince de gel de silice à l'aide du solvant A (technique décrite au chapitre I). Le R_f de l'INHPLP (traitée ou non par le BH_4Na) est égal à 0,20 et celui de l'INH est 0,60. L'excès d'hydrazide ne gêne pas la migration.

3) Mesure de la radioactivité - La radioactivité des plaques est mesurée à l'aide de l'enregistreur Berthold.

Ces expériences nous ont permis de constater que:

- la radioactivité de l'hydrazone diminue en fonction du temps d'incubation tandis que celle de l'hydrazide augmente. Cela est en accord avec le phénomène de dissociation

- la vitesse de disparition de l'hydrazone marquée dépend de la concentration du milieu en hydrazide non marqué: au bout d'une heure dans le milieu (3) l'hydrazone marquée a presque complètement disparu alors que dans le milieu (2) il en reste encore 40 p. 100 (fig. 23).

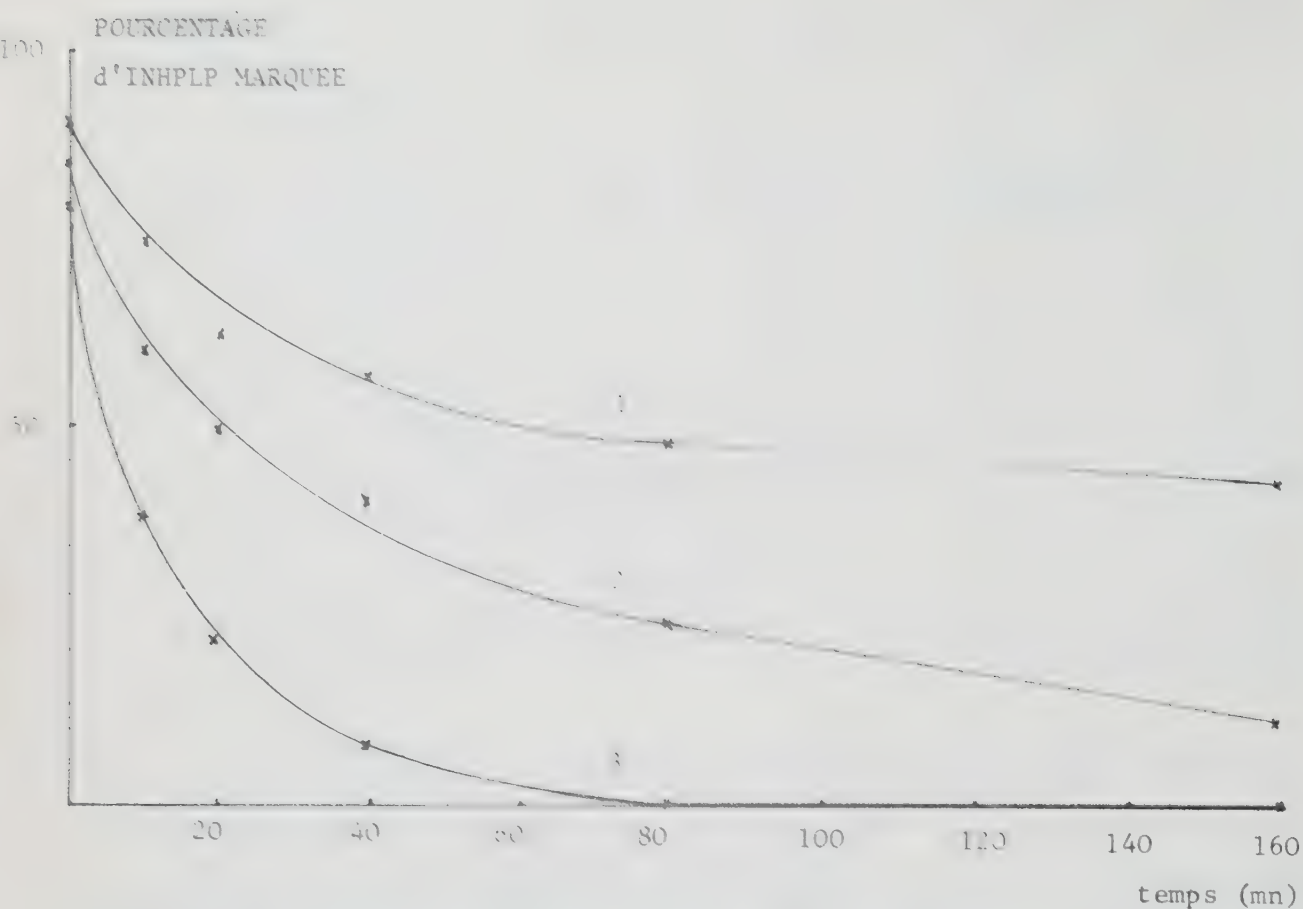


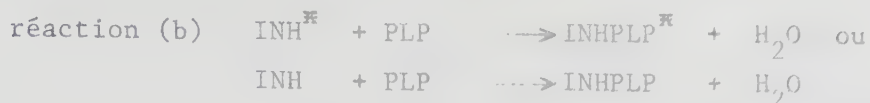
Fig. 23.- Disparition de l'INHPLP marquée au ^{14}C dans un milieu contenant de l'INH -

milieu 1 : INHPLP(^{14}C -2) 10^{-4}M + INH 10^{-3}M

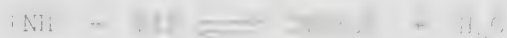
milieu 2 : INHPLP(^{14}C -2) 10^{-4}M + INH 10^{-2}M

milieu 3 : INHPLP(^{14}C -2) 10^{-4}M + INH 10^{-1}M

Ces résultats indiquent que les deux réactions (a) et (b) ont lieu en même temps dans le milieu :



L'hydrazone se dissocie en solution et le PLP et l'INH réagissent pour former à nouveau de l'hydrazone. L'équilibre suivant est atteint :



Pour connaître les proportions d'hydrazone, d'hydrazide et de PLP à l'équilibre, nous avons essayé de déterminer la constante d'équilibre K. Les calculs que nous avons faits à partir de mesures spectrophotométriques n'ont pas donné la valeur de K avec précision. Nous pouvons seulement dire que cette valeur est supérieure à 5.10^5M^{-1} et que l'équilibre est en faveur de l'hydrazone. Cordes et Jencks ont fait la même observation à propos de la semicarbazone de p-chlorobenzaldéhyde: " à l'équilibre l'aldéhyde libre n'existe pas en concentration appréciable " (33).

e) Cinétique de la dissociation de l'INHPLP - influence des composés aminés -

1°) vitesse de dissociation de l'INHPLP -

Nous avons étudié la vitesse de dissociation de l'INHPLP en solution dans du tampon de phosphates 5.10^{-2}M pH 7,4.

Immédiatement après avoir mis l'INHPLP en solution (concentration 3.10^{-5}M) nous avons enregistré son spectre d'absorption. Puis nous avons incubé la solution à 55°C. Ensuite nous avons répété les enregistrements, après divers temps d'incubation.

Nous avons constaté qu'en fonction du temps d'incubation, la densité optique à 295 nm diminuait. Il en était de même pour l'absorption à 330 nm. Au contraire, dans une large bande de longueurs d'onde allant de 380 à 410 nm l'absorption augmentait (fig. 24).

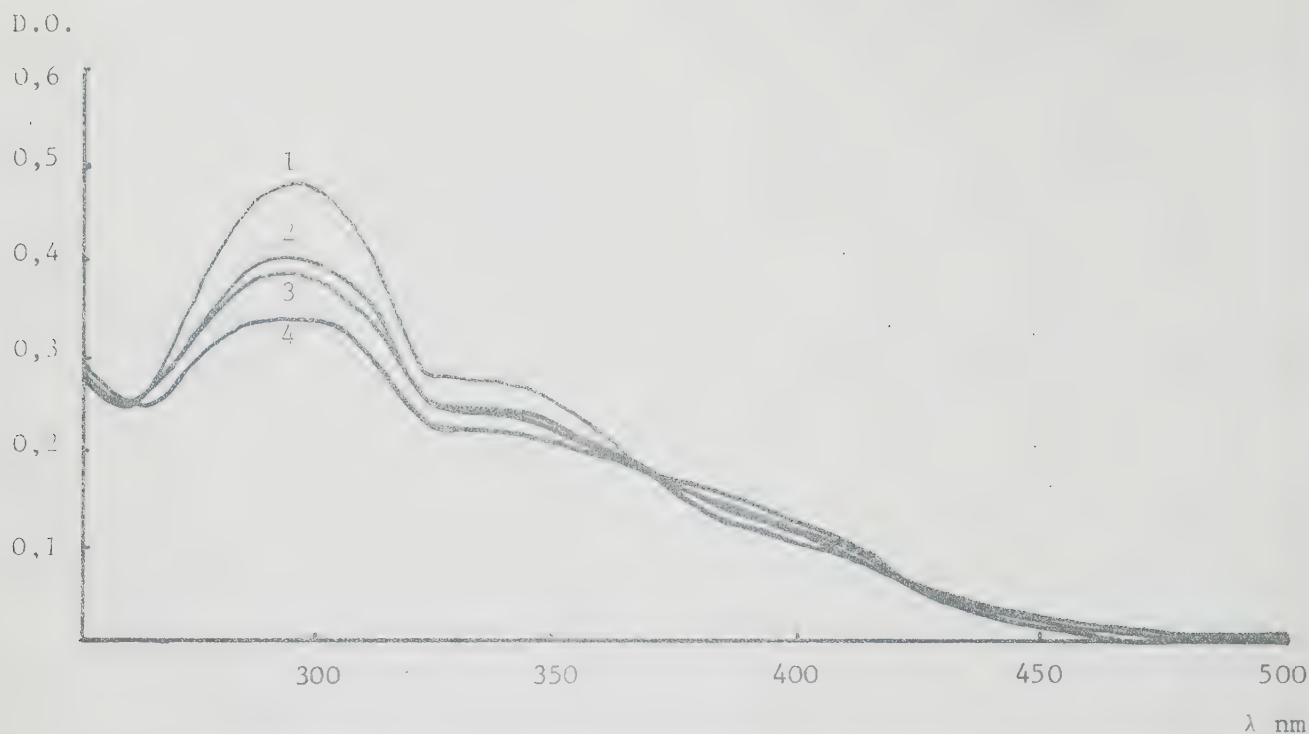


Fig. 24.- Variation du spectre d'absorption de l'INHPLP ($3 \cdot 10^{-5} \text{M}$) en tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ pH 7,4 à 55°C -

Temps d'incubation : 0 mn (spectre 1), 105 mn (spectre 2), 165 mn (spectre 3), 230 mn (spectre 4).

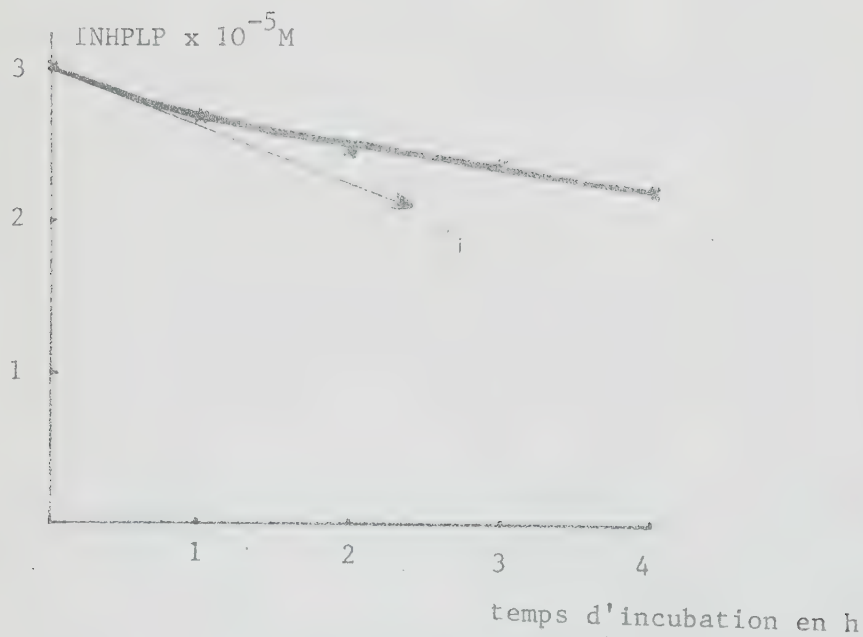


Fig. 25.- Variation de la concentration de l'INHPLP au cours de l'incubation à 55°C .

En comparant le spectre d'absorption de l'INHPLP à ceux du PLP et de l'INH (fig. 26), on voit que ses variations reflètent la dissociation partielle de l'hydrazone en PLP et INH.

Nous avons déterminé la vitesse initiale de la dissociation de l'INHPLP en prenant la tangente à l'origine de la courbe représentant la concentration de l'hydrazone dans le milieu en fonction du temps d'incubation (fig. 25). La concentration de l'hydrazone a été calculée à partir de la densité optique à 295 nm.

La vitesse initiale de dissociation de l'INHPLP est égale à $0,8.10^{-9} \text{ M.s}^{-1}$ dans les conditions d'expérience (solution 3.10^{-5} M en tampon de phosphates à 55°C).

2°) vitesse de dissociation de l'INHPLP en présence de composé aminé -

α) en présence de tris

Nous avons mesuré la vitesse de dissociation de l'INHPLP en présence de tris 5.10^{-2} M et de tris 1 M.

Tris 5.10^{-2} M -

Nous avons effectué des mesures à 20° et à 55°C . L'INHPLP était mise en solution directement dans du tampon de tris 5.10^{-2} M pH 7,4. La solution était soit maintenue à 20°C (concentration de l'INHPLP = $2,8.10^{-5} \text{ M}$) soit placée à 55°C (concentration de l'INHPLP = 3.10^{-5} M). Les spectres étaient enregistrés toutes les heures pendant six heures.

L'INH libéré était dosé simultanément par la méthode à l'o.phénanthroline- Fe^{+++} .

Tris 1 M -

L'INHPLP et le tris étaient dissous séparément dans du tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4. Les deux solutions étaient mélangées de manière à obtenir une concentration en INHPLP égale à 3.10^{-5} M et une concentration en tris égale à 1 M. Le temps zéro de l'expérience était pris au moment du mélange des deux solutions (*)

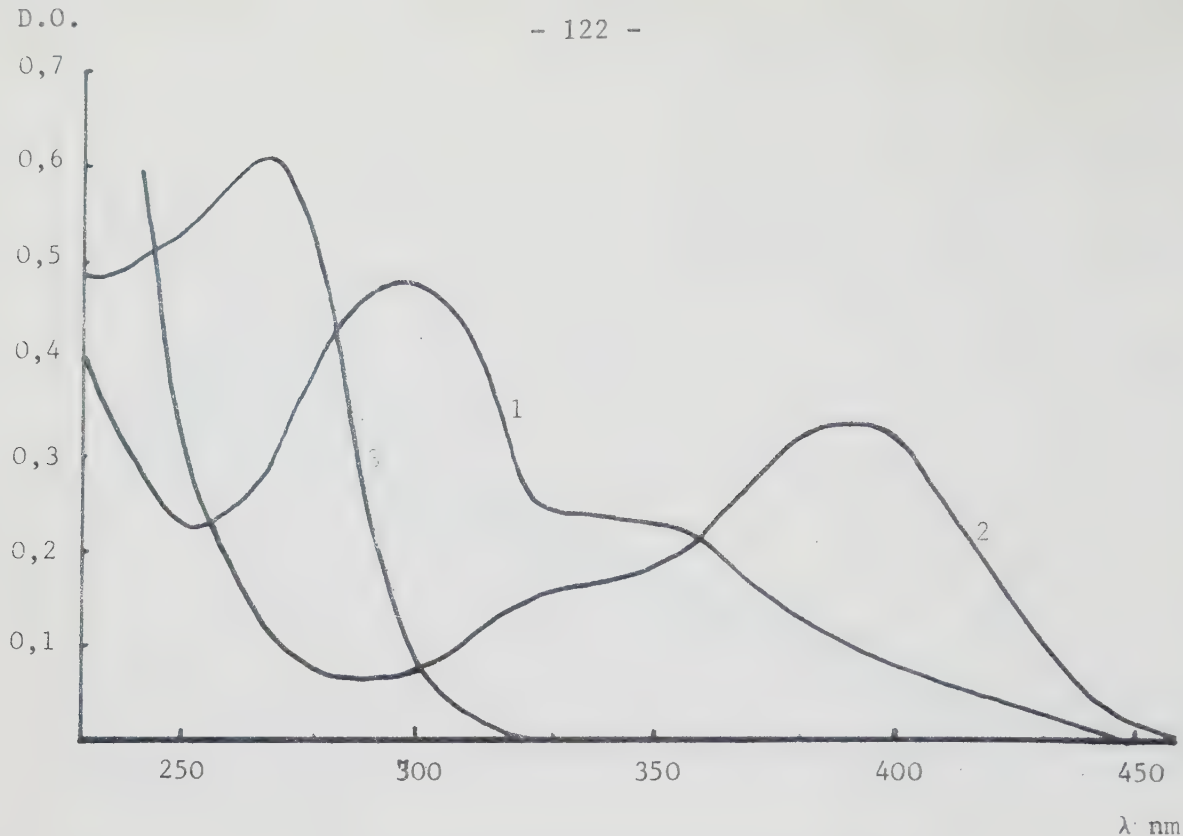


Fig. 26.- Spectres d'absorption de l'INHPLP, du PLP et de l'INH -

INHPLP $3 \cdot 10^{-5}$ M (spectre 1)

PLP $7 \cdot 10^{-5}$ M (spectre 2)

INH $14,6 \cdot 10^{-5}$ M (spectre 3)

Les 3 composés sont mis en solution dans du tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4

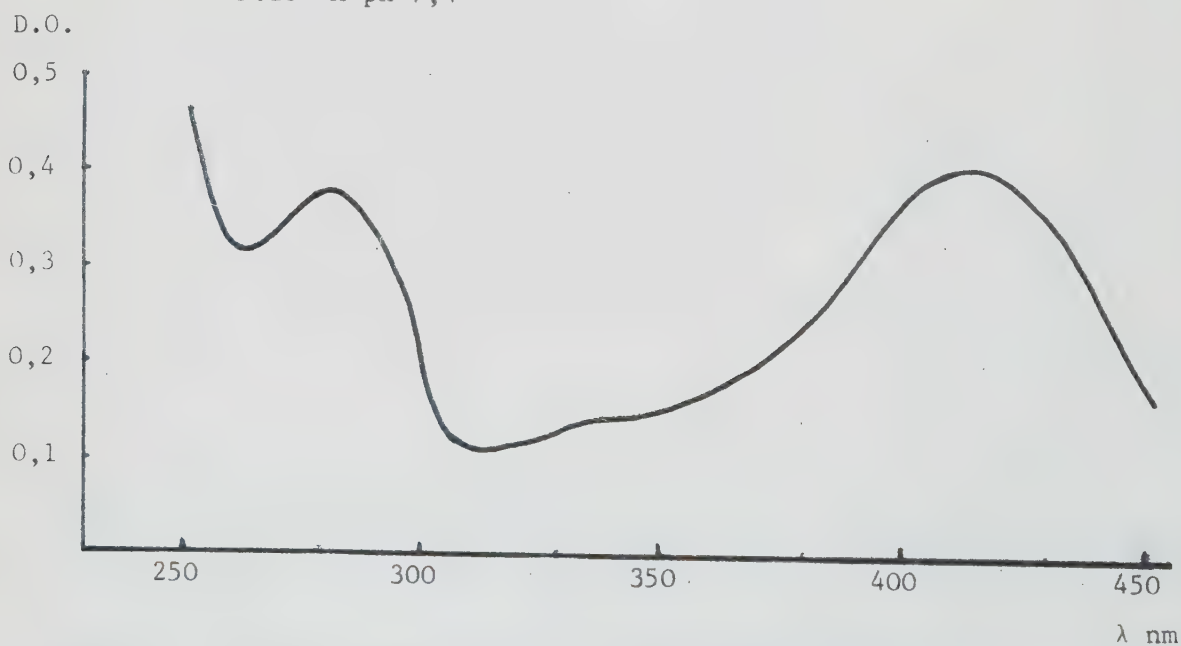


Fig. 27.- Spectre d'absorption de la base de Schiff du PLP avec le tris -

base de Schiff $7 \cdot 10^{-5}$ M en solution tampon de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,4

Le mélange était maintenu à la température du laboratoire pendant 70 mn et les spectres étaient enregistrés à différents intervalles de temps.

Le dosage de l'INH par la méthode à l'o.phénanthroline-Fe⁺⁺⁺ n'était pas réalisable en milieu tris 1 M.

Nous avons constaté que:

le maximum d'absorption à 295 nm diminue dans les trois cas:

tris 5.10^{-2} M à 20°C

tris 5.10^{-2} M à 55°C

tris 1 M à 20°C

pendant l'incubation

un maximum d'absorption à 270 nm apparaît sauf dans le milieu tris 5.10^{-2} M, 20°C, où nous avons seulement observé un déplacement du maximum à 295 nm vers 280 nm

l'absorption à 400-410 nm augmente pendant l'incubation.

Nous avons représenté les variations du spectre d'absorption de l'INHPLP en présence de tris 1 M sur la figure 28.

Les modifications observées, en particulier l'augmentation de l'absorption à 400-410 nm, indiquent que l'INHPLP, en se dissociant, libère du PLP qui réagit en partie avec le composé aminé pour donner une base de Schiff dont le maximum d'absorption est situé entre 400 et 415 nm (94). Le spectre de la base de Schiff formée entre le PLP et le tris est donné sur la figure 27.

En même temps la concentration de l'INH libre dans le milieu augmente.

Nous avons calculé les vitesses initiales de dissociation de l'INHPLP à partir des courbes représentant la variation de la concentration de l'hydrazone en fonction du temps d'incubation. Nous avons représenté sur la figure 29 la courbe obtenue en présence de tris 1 M et sur la figure 30 celles obtenues en présence de tris 5.10^{-2} M.

(*) Nous n'avons pas dissous l'hydrazone dans la solution de tris comme précédemment pour pouvoir déterminer avec précision le temps zéro de l'expérience car la dissociation de l'hydrazone en tampon tris 1 M est beaucoup plus rapide qu'en tampon tris 5.10^{-2} M.

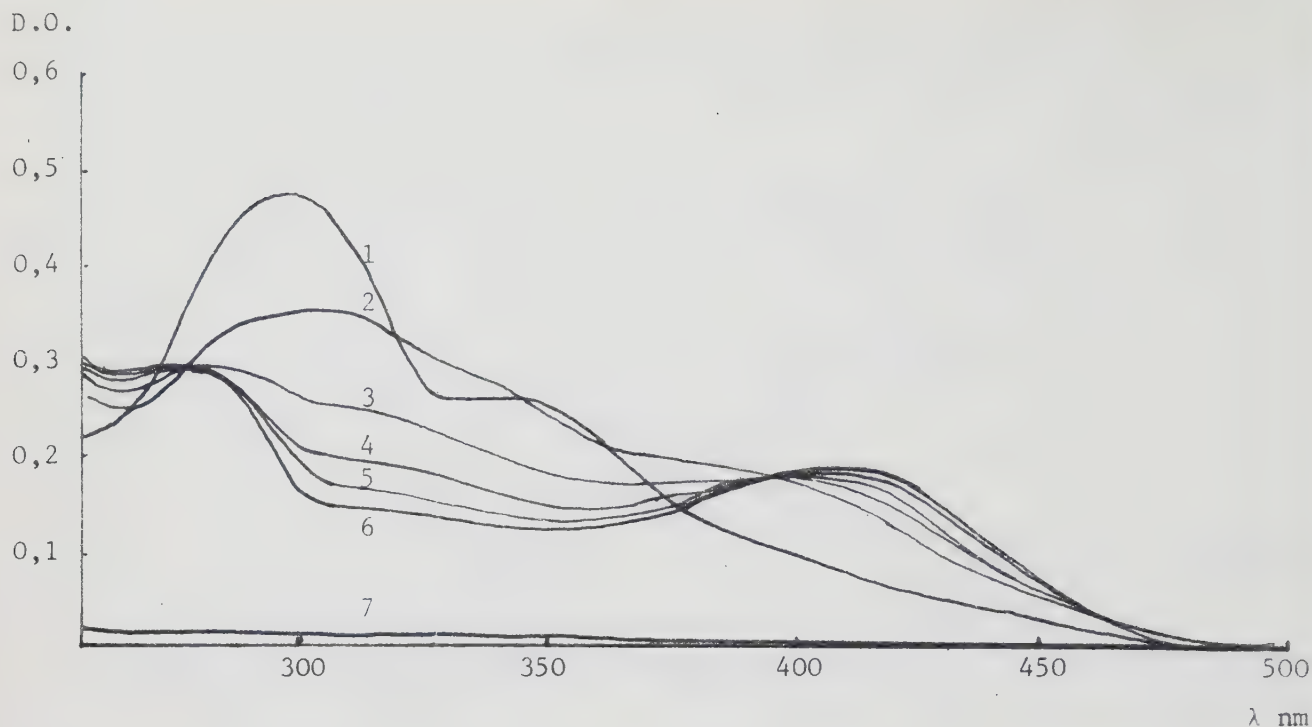


Fig. 28.- Variation du spectre d'absorption de l'INHPLP en présence de tris 1 M.
INHPLP $3 \cdot 10^{-5}$ M (spectre 1) - INHPLP $3 \cdot 10^{-5}$ M additionnée de tris 1 M
(spectre 2) après 15 mn de contact (spectre 3) après 30 mn (spectre 4)
après 45 mn (spectre 5) après 60 mn (spectre 6) - tris 1 M (spectre 7)

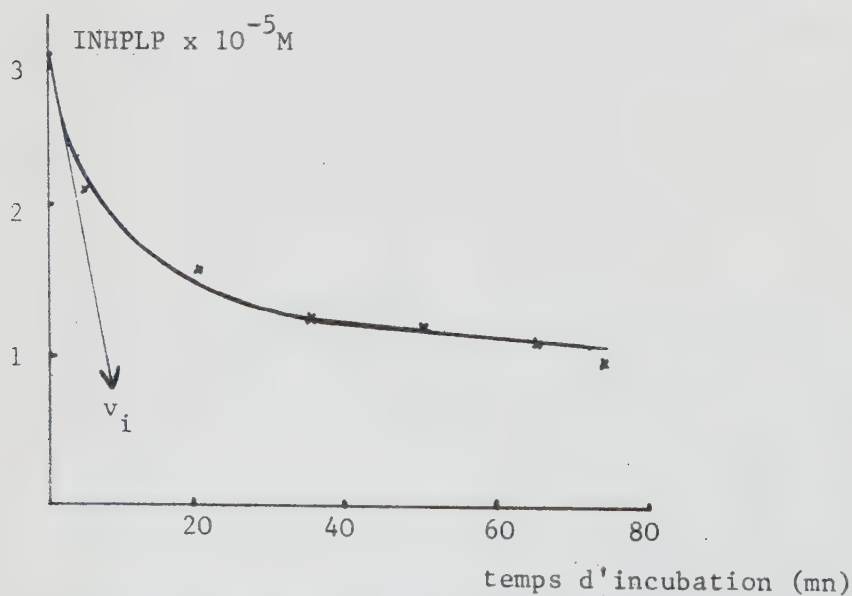


Fig. 29.- Variation de la concentration de l'INHPLP au cours de l'incubation
avec du tris 1 M.

Il faut cependant noter que la concentration de l'INHPLP calculée à partir de la valeur de la densité optique à 295 nm ne correspond pas exactement à la concentration réelle puisque le PLP libéré est en partie combiné au tris sous forme de base de Schiff qui possède une certaine absorption à 295 nm ($\epsilon_{295} = 3.140$). Néanmoins, cette différence peut être considérée comme négligeable au début de la réaction. Il en sera de même dans le cas des autres composés aminés étudiés.

Les valeurs que nous avons obtenues sont données dans le tableau 27.

Dans le cas du tris 5.10^{-2} M nous avons également déterminé les vitesses initiales de dissociation à partir des concentrations en INH (fig. 30):

$$v_i \text{ à } 20^{\circ}\text{C} = 0,44.10^{-9} \text{ M.s}^{-1}$$

$$v_i \text{ à } 55^{\circ}\text{C} = 2,60.10^{-9} \text{ M.s}^{-1}$$

Cette dernière valeur est plus élevée que celle calculée à partir de la concentration en INHPLP:

$$v_i \text{ à } 55^{\circ}\text{C} = 1,11.10^{-9} \text{ M.s}^{-1}$$

β) en présence d'acide aminé

Nous avons mesuré la vitesse de dissociation de l'INHPLP en présence des acides aminés suivants: L-sérine, acide glutamique, proline et glycolle. Le pH des solutions était compris entre 7,2 et 7,5.

L-sérine, acide glutamique, proline - Chaque acide aminé était dissous dans du tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4 et mélangé à une solution d'INHPLP dans le même tampon. La concentration finale de l'acide aminé dans le milieu était égale à $5,4.10^{-2}$ M, celle de l'hydrazone était 3.10^{-5} M (la L-sérine et la proline étaient fournies par Hoffmann-La Roche, l'acide glutamique était utilisé sous forme de sel de sodium préparé par nous).

Les solutions étaient incubées à différentes températures: 20°, 37°, 55°C. La durée de l'incubation variait de 3 à 4 heures.

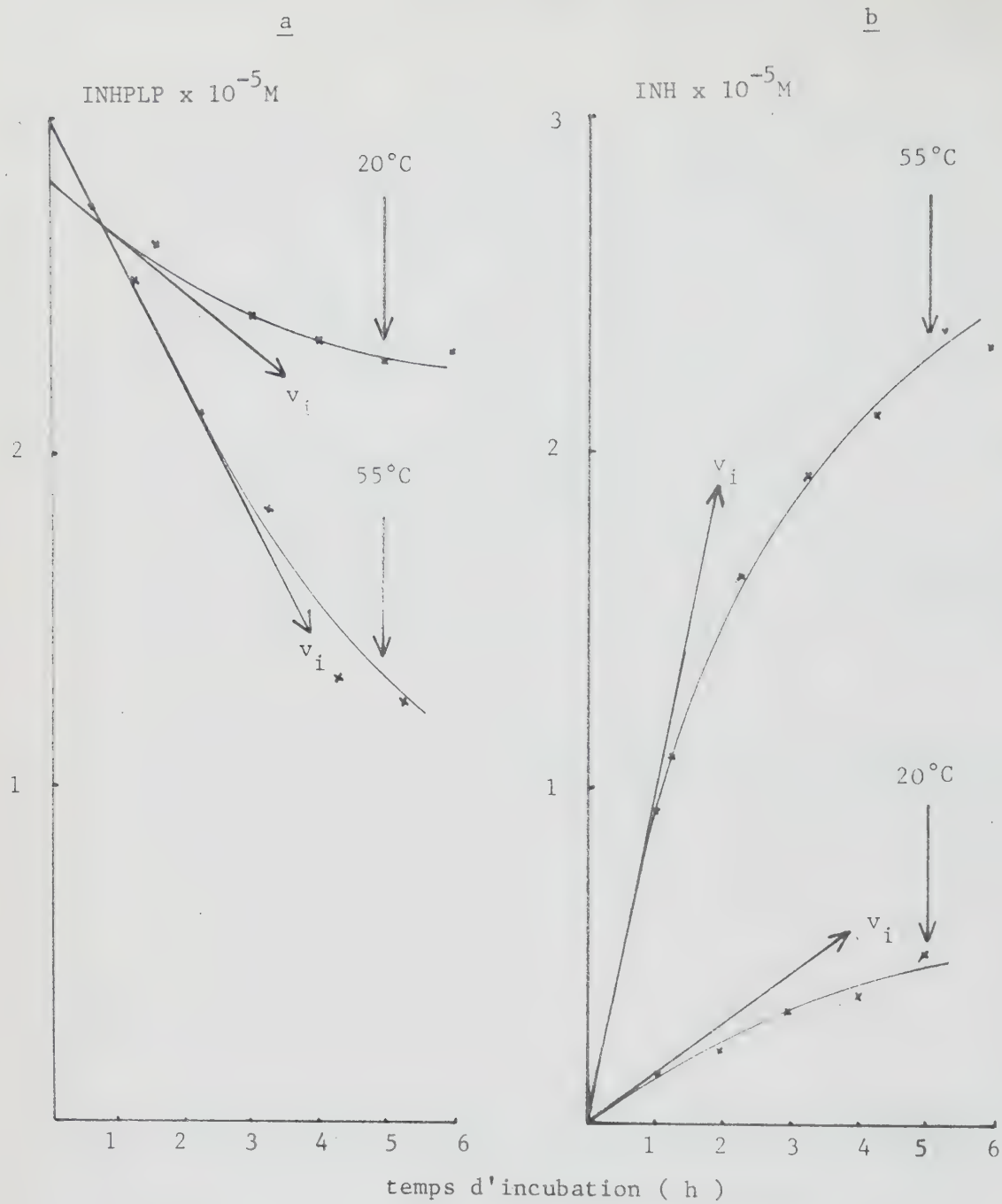


Fig. 30.- Dissociation de l'INHPLP en présence de tris $5.10^{-2} M$ à pH 7,4 à 20° et 55°C.

a : variation de la concentration de l'INHPLP au cours de l'incubation

b : variation de la concentration de l'INH libéré au cours de l'incubation.

Glycocolle - L'INHPLP (3.10^{-5} M) et le glycocolle (1 M) étaient mis en solution dans du tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4 (le glycocolle était un produit Hoffmann-La Roche).

La solution était maintenue à 20°C pendant 65 mn.

Les spectres d'absorption des solutions d'INHPLP et d'acide aminé étaient enregistrés à intervalles de temps réguliers et la concentration de l'INHPLP dans le milieu était calculée à partir de la valeur de la densité optique à 295 nm.

Nous avons constaté que:

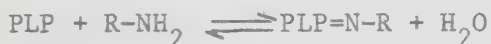
le maximum d'absorption à 295 nm diminue dans tous les cas au cours de l'incubation

une bande d'absorption centrée à 270 nm apparaît en présence de L-sérine, de glutamate à 55°C et de glycocolle, dans le cas de la proline il y a seulement déplacement du maximum à 295 nm vers 280 nm.

l'absorption à 400-410 nm augmente dans tous les cas.

Nous avons représenté les variations du spectre d'absorption de l'INHPLP en présence de L-sérine $5,4.10^{-2}$ M à 37°C sur la figure 31.

Les modifications sont les mêmes que celles que nous avons observées en présence de tris. Le phénomène peut être représenté par les deux réactions suivantes:



où R-NH_2 correspond au composé aminé et PLP=N-R à la base de Schiff formée entre le PLP et le composé aminé.

Les vitesses initiales de dissociation de l'INHPLP déterminées à partir des courbes de concentration de l'hydrazone en fonction du temps (les courbes de la figure 32 représentent la variation de la concentration de l'hydrazone en présence de L-sérine), sont données dans le tableau 27.

En examinant ce tableau, on constate que les composés aminés accélèrent la dissociation de l'INHPLP.

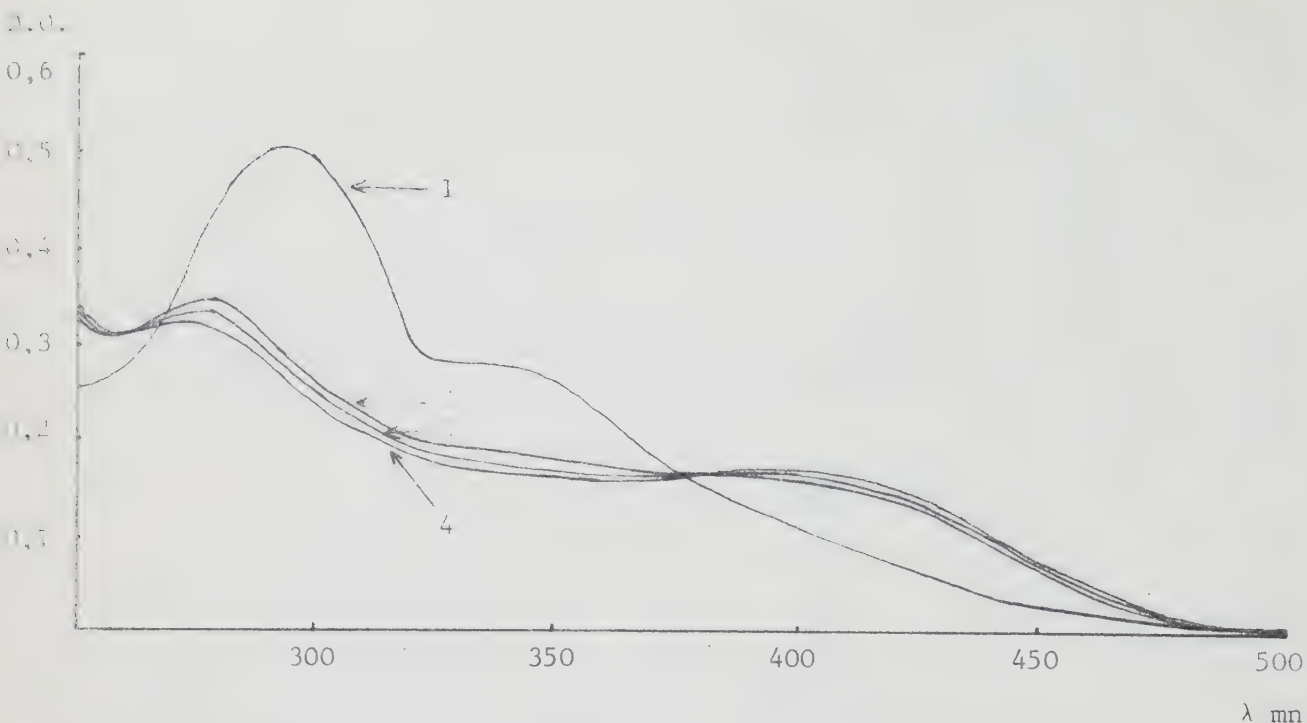


Fig. 31.- Variation du spectre d'absorption de l'INHPLP en présence de L-sérine $5,4 \cdot 10^{-2} M$ à $37^{\circ}C$.

INHPLP $3 \cdot 10^{-5} M$ (spectre 1) - INHPLP $3 \cdot 10^{-5} M$ additionnée de L-sérine $5,4 \cdot 10^{-2} M$ après 1 h de contact (spectre 2) après 2 h (spectre 3) après 3 h (spectre 4).

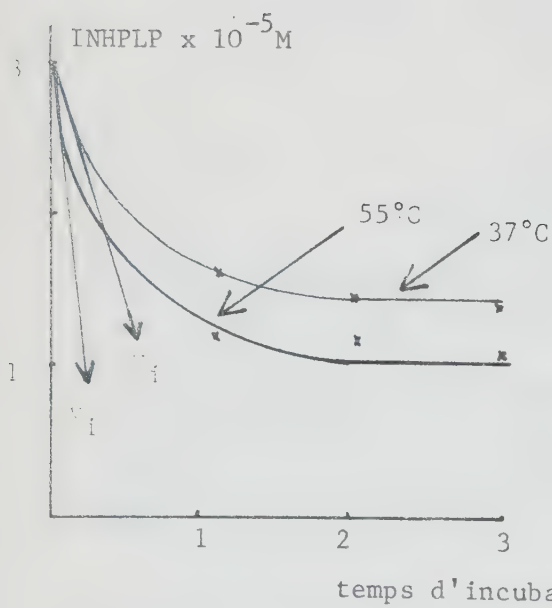


Fig. 32.- Variation de la concentration de l'INHPLP au cours de l'incubation avec de la L-sérine $5,4 \cdot 10^{-2} M$ à 37° et $55^{\circ}C$.

Tableau 27.

Vitesse de dissociation de 1'INHPLP seule et en présence de composés aminés

Concentration de 1'INHPLP M/l	Composé aminé	Concentration du composé aminé M/l	Température de la solution °C	Vitesse initiale M.s ⁻¹
$3 \cdot 10^{-5}$			55	$0,8 \cdot 10^{-9}$
$2,8 \cdot 10^{-5}$	Tris	$5 \cdot 10^{-2}$	20	$0,44 \cdot 10^{-9}$
$3 \cdot 10^{-5}$	Tris	$5 \cdot 10^{-2}$	55	$1,11 \cdot 10^{-9}$
$3 \cdot 10^{-5}$	Tris	1	20	$0,4 \cdot 10^{-7}$
$3 \cdot 10^{-5}$	Gly	1	20	$0,7 \cdot 10^{-7}$
$3 \cdot 10^{-5}$	Ser	$5,4 \cdot 10^{-2}$	37	$8,3 \cdot 10^{-9}$
$3 \cdot 10^{-5}$	Ser	$5,4 \cdot 10^{-2}$	55	$22 \cdot 10^{-9}$
$3 \cdot 10^{-5}$	Glu	$5,4 \cdot 10^{-2}$	20	$1,1 \cdot 10^{-9}$
$3 \cdot 10^{-5}$	Glu	$5,4 \cdot 10^{-2}$	55	$5,5 \cdot 10^{-9}$
$3 \cdot 10^{-5}$	Pro	$5,4 \cdot 10^{-2}$	55	$2,2 \cdot 10^{-9}$

Leur action est plus ou moins marquée. Elle dépend de leur concentration et de la température à laquelle ils ont agi.

La concentration du composé aminé paraît être un facteur important qui mérite d'être étudié.

3°) dissociation de l'INHPLP en fonction de la concentration en L-sérine du milieu -

Nous avons étudié la vitesse de dissociation de l'INHPLP en fonction de la concentration en L-sérine du milieu, en utilisant de l'hydrazone marquée au ^{14}C dans la partie hydrazidique de la molécule.

L'INHPLP marquée, en solution 2.10^{-5}M dans du tampon de phosphates 5.10^{-2}M pH 7,4, était mise en contact avec de la L-sérine à différentes concentrations: 10^{-2} , 5.10^{-2} , 10.10^{-2} , 20.10^{-2}M pendant 60 mn à 37°C . L'incubation étant terminée l'hydrazone et l'hydrazide radioactifs étaient séparés par chromatographie en couche mince et la radioactivité des plaques était enregistrée (voir paragraphe d).

La courbe de la figure 33 représente le pourcentage d'hydrazone non dissociée en fonction de la concentration en L-sérine du milieu.

On constate que la dissociation varie en fonction de la concentration de la L-sérine dans le milieu: elle est d'autant plus importante que la concentration de la L-sérine est plus élevée. En présence de L-sérine 10^{-2}M presque la moitié de l'INHPLP (2.10^{-5}M) disparaît en 60 mn à 37°C , cette concentration correspond à celle de la L-sérine dans le milieu de dosage de la TSase.

f) Influence des composé aminés sur la synthèse de l'INHPLP -

Les composés aminés favorisant la dissociation de l'INHPLP, il est probable qu'ils accélèrent également sa synthèse.

Nous avons étudié l'action du tris et de la L-sérine sur la synthèse de l'INHPLP en utilisant les différences d'absorption à 410 nm qui existent entre le PLP, l'INHPLP et la base de Schiff formée entre le PLP et le composé aminé:

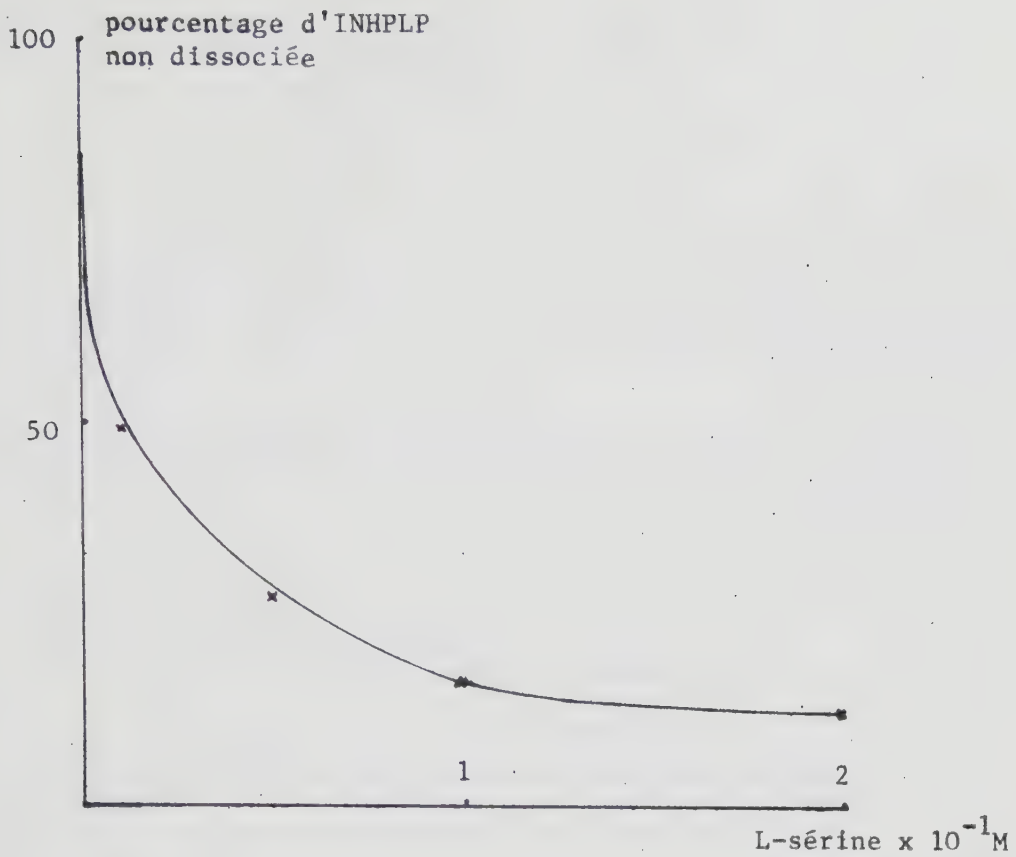


Fig. 33.- Disparition de l'INHPLP marquée au ¹⁴C en fonction de la concentration en L-sérine du milieu -
INHPLP (¹⁴C-2) : 2.10⁻⁵ M
incubation : 60 mn à 37°C..

$$\epsilon_{\lambda_{410}}^{(*)} \text{ PLP} = 3.700$$

$$\epsilon_{\lambda_{410}} \text{ INHPLP} = 2.660$$

$$\epsilon_{\lambda_{410}} \text{ base de Schiff PLP-tris} = 5.700$$

L'hydrazone absorbe moins que le PLP par contre la base de Schiff PLP-tris absorbe plus. Il en est de même pour celle formée entre le PLP et la L-sérine.

Nous avons suivi la synthèse de l'INHPLP en enregistrant la densité optique à 410 nm des milieux de réaction jusqu'au moment où l'absorption était constante.

Tous les réactifs étaient dissous dans du tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4. La température était égale à 20°C.

1°) synthèse en l'absence de composé aminé

Le milieu de réaction contenait du PLP 5.10^{-5} M et de l'INH 5.10^{-3} M. L'excès d'INH avait pour but d'éviter que la réaction de dissociation ait lieu.

Nous avons constaté que la densité optique à 410 nm diminuait au cours de la réaction.

Le temps de demi-réaction ($\text{INH} + \text{PLP} \longrightarrow \text{INHPLP} + \text{H}_2\text{O}$) était égal à 330 sec.

(*) ϵ = coefficient d'extinction moléculaire

2°) synthèse en présence de tris

Nous avons mélangé dans l'ordre suivant :

tris $5.10^{-3}M$

INH $5.10^{-3}M$

PLP $5.10^{-5}M$ (les concentrations indiquées

sont celles du milieu de réaction).

Nous avons constaté que la densité optique à 410 nm augmentait d'abord puis diminuait ensuite.

On peut en déduire que, dans un premier temps, la synthèse de la base de Schiff l'emporte sur celle de l'hydrazone qui prédomine ensuite.

Le temps de demi-réaction était égal à 200 sec.

3°) synthèse en présence de L-sérine

première expérience - nous avons opéré comme pour le tris :

L-sérine $5.10^{-3}M$

INH $5.10^{-3}M$

PLP $5.10^{-5}M$

Nous avons observé que pendant les premières secondes qui suivaient le mélange des réactifs la densité optique à 410 nm demeurait constante puis qu'elle diminuait.

Le temps de demi-réaction était égal à 170 sec.

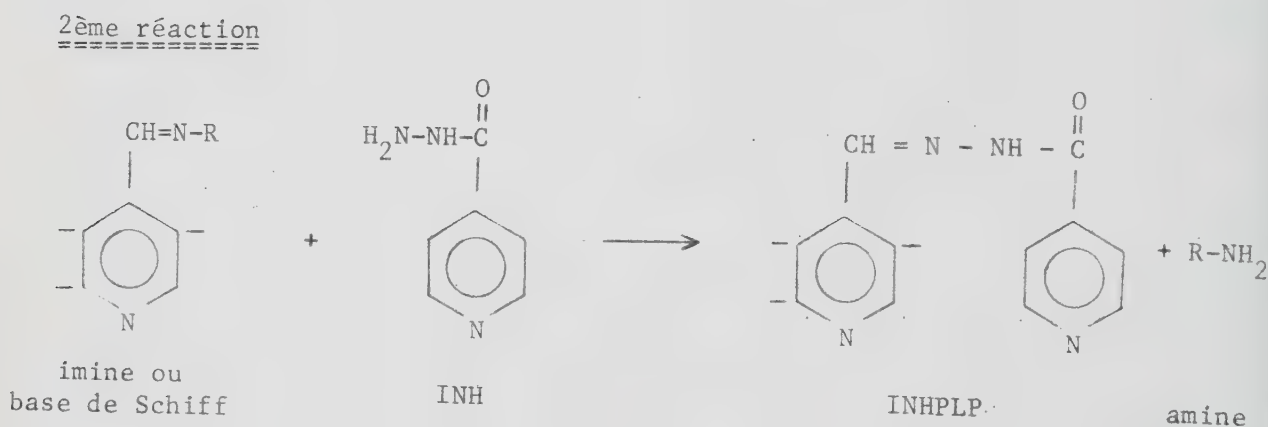
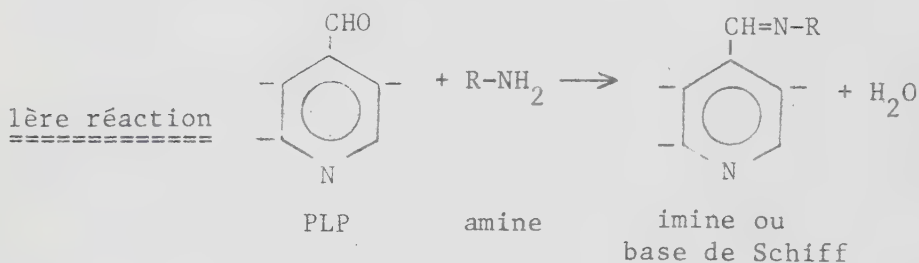
deuxième expérience - nous avons d'abord préparé la base de Schiff PLP-sérine puis nous avons ajouté l'INH dans le milieu. Les concentrations de chaque composé étaient les mêmes que celles de l'expérience précédente.

Nous avons constaté que la densité optique à 410 nm diminuait rapidement.

Le temps de demi-réaction était égal à 37 sec.

Les temps de demi-réaction mettent en évidence l'influence favorable qu'exercent le tris et la L-sérine sur la synthèse de l'INHPLP.

La L-sérine a une action particulièrement efficace quand elle est combinée au PLP sous forme de base de Schiff. Cela suggère que le processus suivant a lieu :



Cordes et Jencks ont proposé un mécanisme analogue à celui-ci pour expliquer la synthèse de la semicarbazone et de l'oxime de p-chlorobenzaldéhyde en présence d'aniline (33). Ces auteurs ont également étudié l'influence d'amines primaires et secondaires sur la synthèse des semicarbazones de pyridoxal et de PLP, ils ont toujours constaté une catalyse (78). Ces différentes observations montrent que le PLP combiné à une amine réagit plus vite avec un hydrazide que le PLP libre.

La formation d'une hydrazone est le résultat d'une réaction nucléophile au cours de laquelle le doublet électronique de l'azote hydrazidique ou hydrazinique attaque le carbone aldéhydique (97). Il est vraisemblable que cette réaction est facilitée, quand l'aldéhyde est combiné à une amine, par le fait que le carbone aldéhydique est alors plus électrophile. D'après Pullman (109) le carbone aldéhydique du pyridoxal combiné à un acide aminé sous forme de base de Schiff porte effectivement une charge positive.

En conclusion, les éléments essentiels qui se dégagent de l'étude de la stabilité de l'INHPLP en solution aqueuse neutre sont les suivants:

- l'hydrazone, en solution, est en équilibre avec le PLP et l'INH
- l'équilibre est atteint lentement
- l'équilibre est en faveur de l'hydrazone
- les composés aminés, en particulier les acides aminés, accélèrent la dissociation et la synthèse de l'hydrazone en solution et déplacent l'équilibre vers la dissociation.

Nous nous sommes demandé si les caractères de l'INHPLP en solution étaient ceux de toutes les hydrazones.

Nous avons étudié le comportement de la semicarbazone de PLP en solution aqueuse neutre.

Nous avons constaté:

- que la semicarbazone est en équilibre avec ses constituants,
- que l'équilibre est en faveur de l'hydrazone: la constante d'équilibre K est de l'ordre de 10^6 ,
- que, sous l'action de composés aminés (tris 1 M et glycocolle 1 M) le spectre de l'hydrazone ($5 \cdot 10^{-5}$ M) subit les mêmes modifications que celles observées dans le cas de l'INHPLP.

Nous pensons que les caractères de l'INHPLP qui ressortent de l'étude de la stabilité de cette hydrazone en solution s'appliquent à l'ensemble des hydrazones de PLP.

2ème partie - STABILITE DES HYDRAZONES DE PLP EN PRESENCE DE PREPARATIONS ENZYMATIQUES

a) Stabilité de l'INHPLP en présence de DOPA décarboxylase -

Nous avons étudié la stabilité de l'INHPLP en présence de DOPA décarboxylase et sa fixation sur l'enzyme, en réalisant les deux expériences suivantes:

1ère expérience: activation d'une préparation de DOPA décarboxylase
après contact avec de l'INHPLP -

Nous avons mis en contact de l'INHPLP et de la DOPA décarboxylase dans les proportions suivantes:

20 nmoles d'INHPLP pour une quantité de protéines (5 mg) catalysant, en présence d'un excès de PLP, la décarboxylation de 5 μ moles de substrat. La concentration de l'INHPLP dans le milieu était: $7,4 \cdot 10^{-5}$ M. La préparation enzymatique (étape II de la purification) était partiellement privée de PLP (voir chapitre III).

Après une incubation de 5 mn à 5°C, nous avons isolé les protéines du milieu par filtration sur gel de sephadex G-25 et nous avons mesuré leur activité.

Nous avons effectué la même expérience avec du PLP à la place d'INHPLP.

Résultats -(tableau 28).

Les activités enzymatiques mesurées après incubation sont supérieures à celles mesurées avant incubation en l'absence de coenzyme et inférieures à celles mesurées en présence d'un excès de coenzyme.

Protéines incubées avec le PLP - L'augmentation de leur activité est due à la fixation du PLP sur les sites spécifiques. Néanmoins la décarboxylation qu'elles catalysent n'est pas maximale car, pour cela, il faudrait que le PLP soit en excès dans le milieu de réaction (7).

Tableau 28.

Activation de deux préparations de DOPA décarboxylase après contact avec
du PLP ou de 1'INHPLP

QCO ₂ (*) en l'absence de coenzyme	4,5	7
QCO ₂ en présence d'un excès de coenzyme (a)	40	67
QCO ₂ en l'absence de coenzyme, après incubation et filtration :		
incubation avec 1'INHPLP (b)	9	
incubation avec le PLP		20

(*) QCO₂ : activité spécifique de la préparation enzymatique mesurée à
pH 7,4 en présence de L-DOPA $3,2 \cdot 10^{-3}$ M et exprimée en n moles de CO₂/mg
de protéines/mn

(a) INHPLP ou PLP : $8 \cdot 10^{-5}$ M

(b) la préparation enzymatique (étape II de la purification partiellement
privée de PLP) est incubée pendant 5 mn à 5°C avec de 1'INHPLP ou du PLP
($7,4 \cdot 10^{-5}$ M) puis séparée par filtration sur gel de sephadex G-25

Protéines incubées avec l'INHPLP - L'augmentation de leur activité est le résultat:

de la fixation de l'hydrazone

ou de celle du PLP libéré à partir de l'hydrazone.

2ème expérience: fixation d'INHPLP marquée au ^{14}C sur une
préparation de DOPA décarboxylase -

Pour connaître la nature du composé fixé sur l'enzyme incubée avec l'INHPLP, nous avons répété cette expérience avec de l'hydrazone marquée au ^{14}C dans la partie hydrazidique de la molécule.

Nous avons incubé la préparation de DOPA décarboxylase avec l'hydrazone marquée puis nous avons isolé les protéines par filtration sur gel de sephadex G-10 et nous avons mesuré leur radioactivité. En même temps nous avons réalisé un essai témoin avec de l'INH marqué au ^{14}C pour vérifier qu'il ne se fixait pas sur l'enzyme.

Nous avons mis en contact l'INHPLP marquée (ou l'INH marqué) et la DOPA décarboxylase dans les proportions suivantes:

5 n moles d'hydrazone (ou d'hydrazide) pour une quantité de protéines (7 mg) catalysant, en présence d'un excès de coenzyme, la décarboxylation de 4 ~~moles~~ μmoles de substrat. La concentration dans le milieu de l'INHPLP marquée (ou de l'INH marqué) était: 1.10^{-5}M .

Après une incubation de 60 mn à 37°C , nous avons filtré le milieu sur gel de sephadex G-10 et nous avons mesuré la radioactivité des fractions de l'éluat à l'aide du mélange scintillant B.

L'utilisation de gel de sephadex G-10 nous a permis de séparer les protéines, l'INH et l'INHPLP. Dans les conditions expérimentales choisies (hauteur du gel = 54 cm, diamètre de la colonne = 1 cm, tampon de phosphates 5.10^{-2}M pH 7,4) les volumes d'élution (V_e) étaient:

V_e protéines = 23 ml

V_e INH = 58 ml

V_e INHPLP = 90 ml.

Résultats -

Protéines incubées avec l'INH (^{14}C -2) - La radioactivité de l'éluat se répartit ainsi:

protéines :	1 p. 100
INH :	99 p. 100

Le pourcentage de radioactivité fixée sur les protéines correspond à 0,05 n mole d'INH.

Protéines incubées avec l'INHPLP (^{14}C -2) - La radioactivité de l'éluat se répartit ainsi:

protéines :	7 p. 100
INH	93 p. 100
INHPLP	0 p. 100

Le pourcentage de radioactivité fixée sur les protéines correspond à 0,35 n mole d'INHPLP.

En examinant ces résultats, nous constatons que l'INH ne se fixe pratiquement pas sur la préparation enzymatique. Donc la radioactivité retenue par les protéines incubées avec l'hydrazone marquée correspond à de l'INHPLP non dissocié. L'hydrazone ainsi fixée aux protéines échappe à l'hydrolyse que subissent pendant la filtration les autres molécules. En effet, nous avons vu au paragraphe c. de la première partie de ce chapitre que l'INHPLP en solution 10^{-5} molaire est complètement dissociée au cours d'une filtration réalisée en milieu tampon de phosphates. Cela explique que l'on ne décele pas de radioactivité au niveau de l'hydrazone.

Les expériences que nous venons de décrire montrent que l'INHPLP se fixe sur la préparation de DOPA décarboxylase: 0,35 n mole pour 7 mg de protéines. Mais étant donné que la préparation enzymatique que nous avons utilisée ne correspond pas à une enzyme pure, nous ne pouvons pas affirmer qu'il s'agit d'une fixation spécifique sur l'enzyme.

L'utilisation d'une préparation enzymatique partiellement purifiée ne permet pas de pousser les investigations et seules des enzymes pures peuvent convenir à l'étude du mécanisme d'action des dérivés du PLP.

b) Stabilité des hydrazones de PLP en présence d'enzymes pures -

Nous avons utilisé deux enzymes pyridoxaliques pures : l'AAT et la TSase β_2 . Ces enzymes diffèrent :

- par le type de réaction qu'elles catalysent
- par la manière dont le PLP intervient au cours de la catalyse.

L'AAT catalyse le transfert du groupe aminé de l'acide aspartique à l'acide cétoglutarique et celui du groupe aminé de l'acide glutamique à l'acide oxaloacétique. La réaction s'effectue par l'intermédiaire du PLP qui joue le rôle d'accepteur du groupe aminé. Pendant toute la catalyse enzymatique, le coenzyme reste lié à l'apoenzyme, tantôt sous la forme aldéhyde (PLP), tantôt sous la forme amine (PMP). Il y a deux molécules de coenzyme par molécule de transaminase (43).

La TSase β_2 catalyse deux réactions: la synthèse du L-tryptophane à partir de la L-sérine et de l'indol et la transformation de la L-sérine en pyruvate et ammoniacque. Pendant la catalyse, le PLP doit être en excès dans le milieu pour que la vitesse de réaction soit maximale. Une partie du PLP est liée au site actif de l'enzyme; l'autre partie est libre dans le milieu. Le PLP attaché à l'enzyme réagit avec le substrat et, la réaction terminée, se détache de la surface protéique. Le PLP, en solution dans le milieu, se fixe sur l'enzyme au moment où le site actif redevient libre. Le coenzyme est ainsi renouvelé au cours de la catalyse.

Ces enzymes conviennent bien à l'étude du mode d'action des hydrazones de PLP. L'AAT est activée par de nombreux dérivés du PLP, en particulier par la benzylhydrazone de PLP. La TSase β_2 catalyse aussi bien la synthèse du L-tryptophane en présence d'INHPLP qu'en présence de PLP.

1°) Stabilité de la benzylhydrazone de PLP en présence d'AAT -

Avant de décrire les expériences que nous avons réalisées, nous rappellerons brièvement quelques propriétés de l'AAT.

Cette enzyme existe sous deux formes qui se distinguent l'une de l'autre par la nature du coenzyme lié à l'apoenzyme: la transaminase-PLP et la transaminase-PMP. Pendant la réaction enzymatique, il y a passage de la forme-PLP à la forme-PMP et vice versa:



On peut distinguer les deux formes de transaminase par leurs spectres d'absorption.

Le spectre de la transaminase-PLP dépend du pH du milieu.

Quand le pH augmente, on constate un déplacement du spectre de la préparation enzymatique et l'apparition des propriétés catalytiques: l'enzyme jaune ($\lambda \text{ max} = 430 \text{ nm}$) inactive devient incolore ($\lambda \text{ max} = 362 \text{ nm}$) et active (80).

Le spectre de la transaminase-PMP ne varie pas en fonction du pH. Le maximum d'absorption est situé à 333 nm (81).

En outre il faut noter que le spectre de l'apotransaminase ne présente pas de maximum d'absorption en plus du maximum à 278 nm caractéristique des protéines.

Les expériences que nous avons réalisées avec l'apotransaminase et la benzylhydrazone de PLP reposent sur les faits expérimentaux suivants:

- la transaminase-PLP s'obtient en incubant l'apotransaminase avec du PLP (43)

- le passage de la transaminase-PLP à la transaminase-PMP se fait par addition d'acide aminé substrat en excès à la transaminase-PLP: acide aspartique ou acide glutamique (81)

- l'addition à la transaminase-PLP d'acide érythro β -hydroxy aspartique, dont la transamination est pratiquement nulle, permet d'obtenir le premier complexe intermédiaire de la réaction: celui formé entre l'enzyme-PLP et l'acide érythro β -hydroxy aspartique lui-même. Ce complexe présente un maximum d'absorption à 492 nm et sa vitesse d'apparition croît avec la température de 25° à 50°C (79,43).

1ère expérience: fixation de la benzylhydrazone de PLP sur l'AAT -

Nous avons incubé l'apotransaminase (préparation décrite au chapitre I) (22,5 n moles) avec un excès de benzylhydrazone de PLP (300 n moles) pendant 90 mn à 20°C. La concentration de l'apoenzyme dans le milieu était égale à $7,5 \cdot 10^{-5}$ M, celle de l'hydrazone était égale à 10^{-3} M.

Ensuite nous avons dialysé le milieu contre du tampon de phosphates 10^{-1} M pH 7,4 pour éliminer l'hydrazone non fixée.

Enfin nous avons enregistré le spectre d'absorption du dialysat, (*dialysat AAT-hydrazone*) contre le tampon de dialyse.

Nous avons effectué la même expérience avec du PLP pour vérifier que, dans les conditions expérimentales utilisées, il y avait formation d'holoenzyme.

Résultats - (fig. 34 a et b).

Avec le PLP, nous avons obtenu un spectre (*spectre du dialysat AAT-PLP*) qui présente un maximum d'absorption à 330 nm et un épaulement vers 360-370 nm. Nous pensons que le maximum à 330 nm correspond à du phosphate de pyridoxamine resté accroché à la protéine au moment de la préparation de l'apoenzyme et que l'épaulement à 360-370 nm indique la fixation du PLP sur l'apoenzyme.

Le spectre du *dialysat AAT-hydrazone* est analogue à celui du *dialysat AAT-PLP*. Il présente, en particulier, un épaulement à 360-370 nm.

Le spectre de la transaminase-PLP, en milieu légèrement alcalin, possède un maximum d'absorption à 360 nm (80). L'oxime de PLP forme avec l'AAT un complexe qui absorbe à 370 nm (102). Si la benzylhydrazone de PLP se fixait sur la transaminase, le complexe ainsi formé pourrait, comme "l'enzyme-oxime", absorber à 370 nm. Or sur les spectres que nous avons obtenus, il est impossible, à cause de la bande d'absorption centrée à 330 nm, de déterminer avec exactitude la longueur d'onde d'absorption maximale dans la région allant de 360 à 370 nm. Par conséquent, on ne peut ni affirmer que l'hydrazone se fixe sur l'AAT ni conclure à sa dissociation en hydrazine et en PLP.

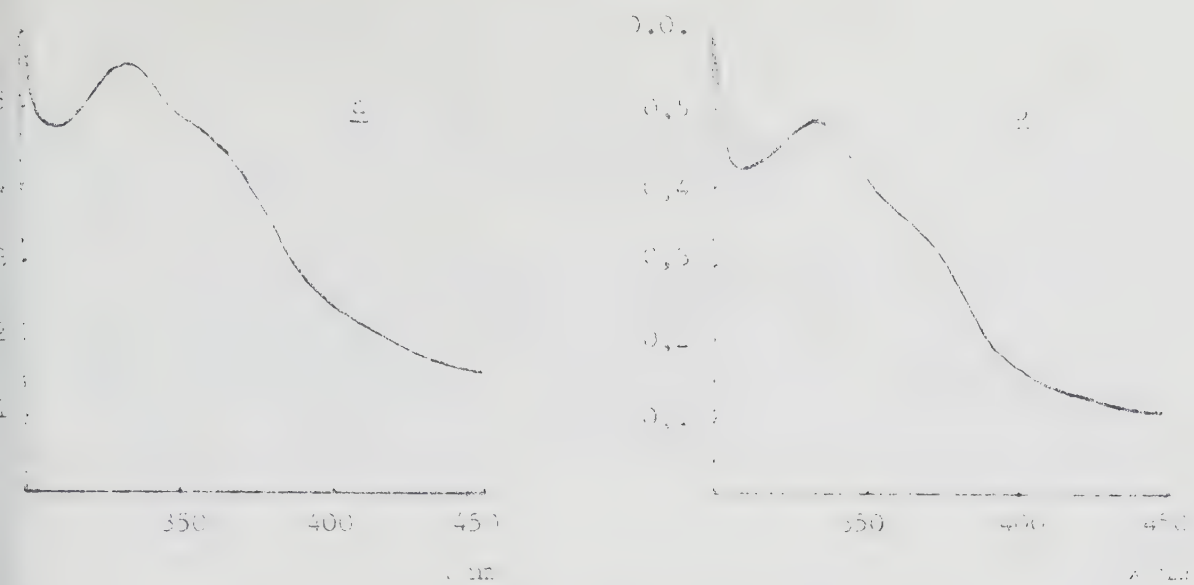


Fig. 34.- Fixation de la benzylindazole sur l'Al³⁺

a : spectre d'absorption du dialysat AAT-ILP - Protéines = 9,1 mg/ml

b : spectre d'absorption du dialysat AAT-indazole, Protéines = 8,6 mg/ml

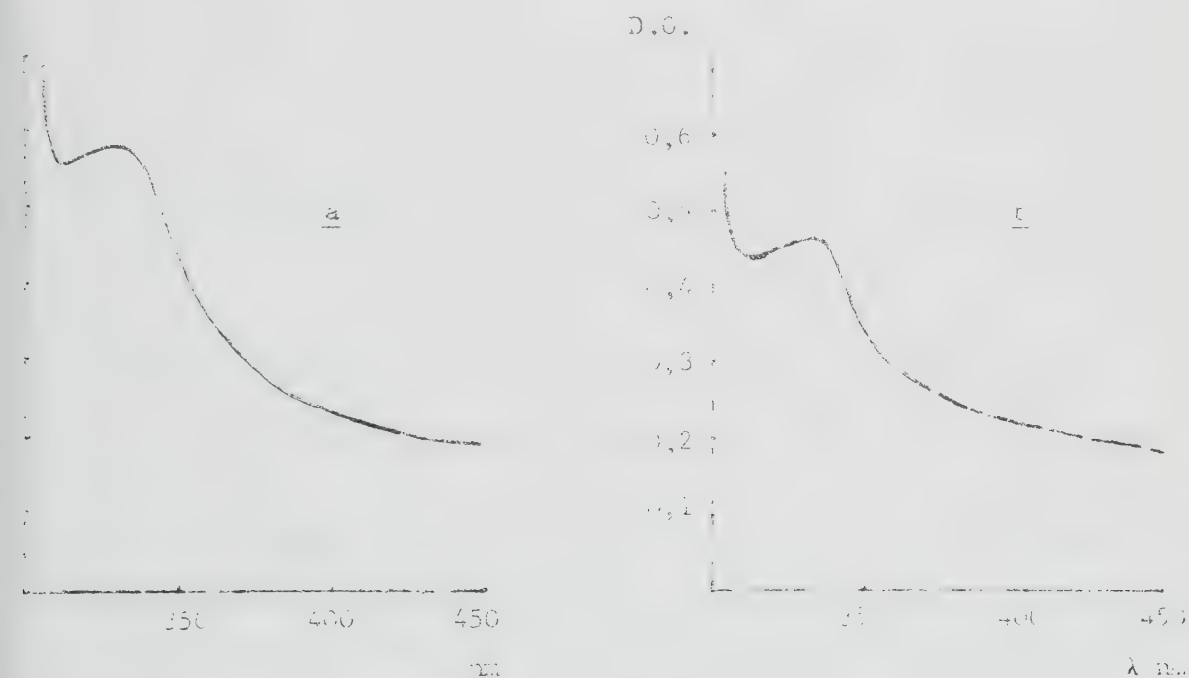


Fig. 35.- Formation de transaminase - ILP -

a : spectre d'absorption du dialysat AAT - 2^e fraction - en la glutamate de sodium - Protéines = 5,7 mg/ml

b : spectre d'absorption du dialysat AAT - pyrazole traité par la glutamate de sodium - Protéines = 6 mg/ml

2ème expérience: formation de transaminase-PMP -

Nous avons soumis les dialysats *AAT-hydrazone* et *AAT-PLP* à l'action du glutamate de sodium. La concentration du glutamate dans les deux milieux était égale à $1,5 \cdot 10^{-1}$ M. Après 60 mn de contact à 20°C, nous avons dialysé les deux milieux contre du tampon de phosphates 10^{-1} M pH 7,4 et nous avons enregistré les spectres d'absorption contre le tampon de dialyse.

Résultats - (fig. 35 a et b).

Les spectres sont identiques. Ils présentent un maximum d'absorption à 330 nm. En outre l'activité enzymatique est la même dans les deux milieux.

Le maximum d'absorption à 330 nm est caractéristique de la transaminase-PMP. Donc cette expérience a mis en évidence la dissociation de la benzylhydrazone de PLP : de la transaminase-PLP est apparue dans le milieu contenant l'hydrazone et sous l'action du glutamate de sodium elle s'est transformée en transaminase-PMP. Du point de vue fonctionnel, le PLP provenant de la dissociation de l'hydrazone a joué le même rôle que le PLP de l'holoenzyme.

3ème expérience: formation du complexe intermédiaire transaminase-PLP-érythro β -hydroxyaspartate -

Nous avons mis en contact les dialysats *AAT-hydrazone* et *AAT-PLP* avec de l'acide érythro β -hydroxyaspartique. Les milieux étaient tamponnés à pH 7,4 et la concentration de l'acide érythro β -hydroxyaspartique était égale à $2 \cdot 10^{-2}$ M.

Nous avons enregistré les spectres d'absorption immédiatement après mélange des dialysats et de l'acide érythro β -hydroxyaspartique. Les cuves du spectrophotomètre étaient thermostatées à 30°C.

Résultats - (fig. 36 a et b).

Nous avons obtenu deux spectres semblables qui présentent un maximum à 490 nm.

Ce maximum d'absorption est caractéristique du complexe intermédiaire formé entre la transaminase-PLP et l'acide érythro β -hydroxyaspartique. Ce résultat confirme celui obtenu dans l'expérience 2. La benzylhydrazone de PLP est instable et il se forme de l'enzyme-PLP.

En conclusion, à la suite de ces expériences, nous pouvions affirmer que la benzylhydrazone de PLP subit une dissociation qui est à l'origine de la formation d'holoenzyme.

Dans les essais suivants nous avons essayé de montrer que le PLP formé à partir de l'hydrazone est responsable de l'activation de l'enzyme.

2°) Stabilité de l'INHPLP en présence de TSase β_2 -

Les expériences réalisées avec la TSase β_2 ont été effectuées en présence de substrat: L-sérine seule ou additionnée d'indol. Elles ont permis d'étudier la stabilité de l'INHPLP pendant la catalyse enzymatique.

Avant de décrire ces expériences, il convient de rappeler que

- l'INHPLP a pour la TSase β_2 une affinité voisine de celle du PLP (K_m INHPLP = $0,6 \cdot 10^{-5} M$)

- le spectre de la TSase β_2 dialysée contre une solution de PLP montre deux bandes d'absorption: l'une centrée à 415 nm, l'autre à 330 nm. La première est due à la liaison aldimine qui existe entre la fonction aldéhyde du PLP et un groupe ϵ -aminé d'un reste lysine de la chaîne protéique. La deuxième correspond à du PLP lié à des molécules de protéines dénaturées (48). La nature de cette liaison n'est pas connue.

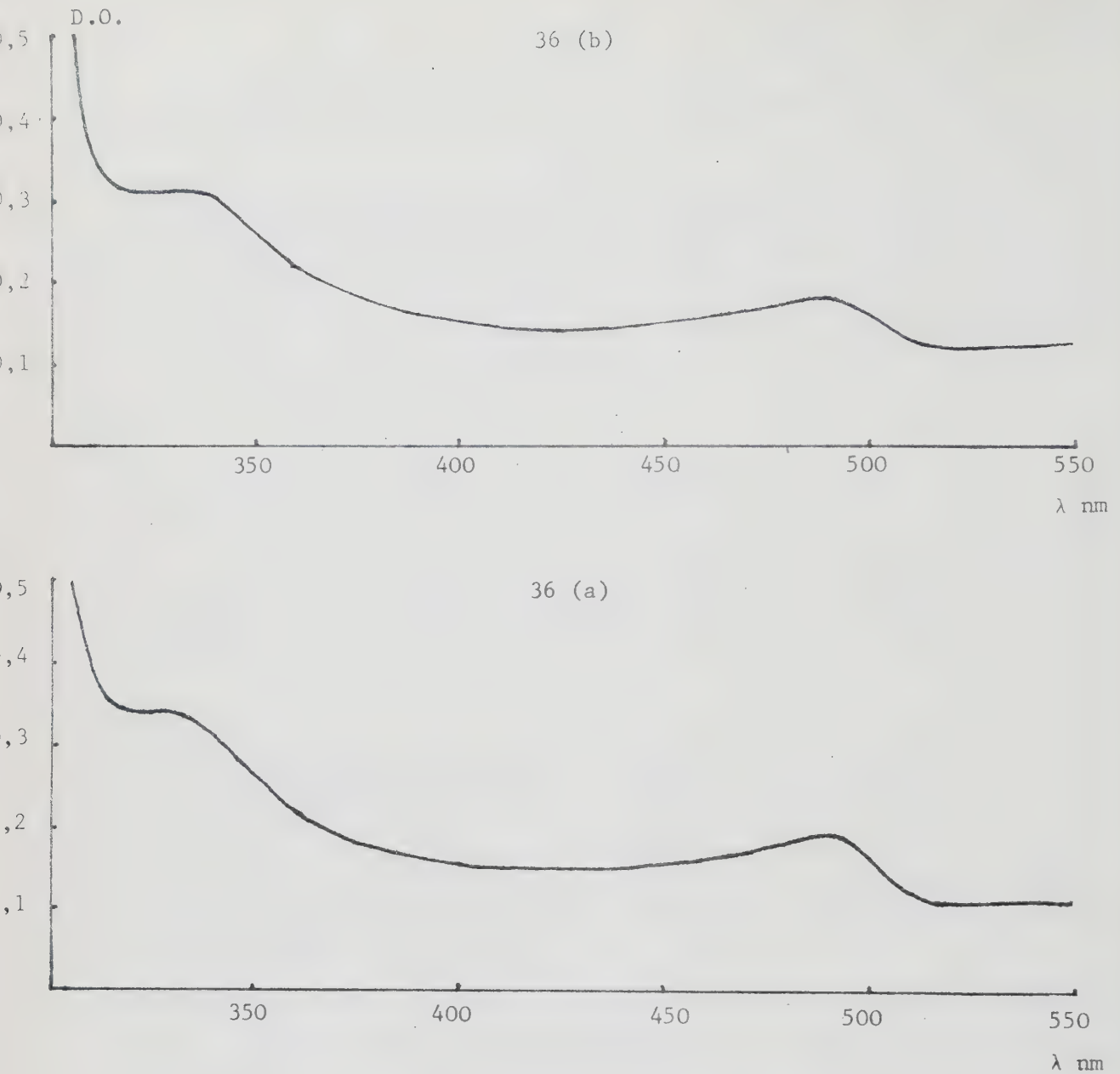


Fig. 36.- Formation du complexe intermédiaire transaminase - PLP - érythro β -hydroxyaspartate -

a : spectre d'absorption du dialysat AAT-PLP additionné d'acide érythro β -hydroxyaspartique - Protéines = 2,5 mg/ml

b : spectre d'absorption du dialysat AAT - hydrazone additionné d'acide érythro β -hydroxyaspartique - Protéines = 2,4 mg/ml

- la liaison aldimine entre le PLP et la TSase β_2 peut être réduite par le BH_4Na . Le traitement par le BH_4Na entraîne la disparition de l'absorption à 415 nm et la perte de l'activité catalytique de l'enzyme par blocage du site actif. En l'absence de PLP, le BH_4Na est sans action sur l'apoenzyme.

1ère expérience: formation d'holoenzyme, au cours de la catalyse enzymatique, à partir de TSase β_2 et d'INHPLP -

Le PLP lié au site actif de la TSase β_2 est renouvelé au cours de la réaction enzymatique. Si l'INHPLP agissait par elle-même, sans subir de scission, elle remplacerait le PLP au moment où celui-ci quitte l'apoenzyme et cela se traduirait sur le spectre d'absorption de la TSase par la disparition de l'absorption à 415 nm et l'apparition d'un nouveau maximum.

Nous avons enregistré le spectre de la TSase β_2 dialysée pendant 15 h à 20°C contre du tampon de phosphates $2 \cdot 10^{-1} \text{M}$ pH 7,8 contenant:

de l'INHPLP	10^{-4}M
de la L-sérine	10^{-2}M
du $\beta\text{-ME}$	10^{-2}M

le spectre était déterminé contre le tampon de dialyse.

Résultats - (fig. 37).

Le spectre du dialysat présente un maximum d'absorption à 415 nm et un autre à 330 nm. Il est semblable à celui de l'holoenzyme.

Par conséquent, l'hydrazone de PLP ne se substitue pas au PLP au cours de la réaction enzymatique, au contraire elle se dissocie et donne naissance à de l'holoenzyme.

D'après ce résultat, en faisant agir du BH_4Na sur de la TSase β_2 additionnée d'INHPLP et de substrat, on doit observer à la fois la perte de l'activité enzymatique et la disparition de l'absorption à 415 nm. Cela a été effectivement constaté en réalisant les expériences 2 et 3.

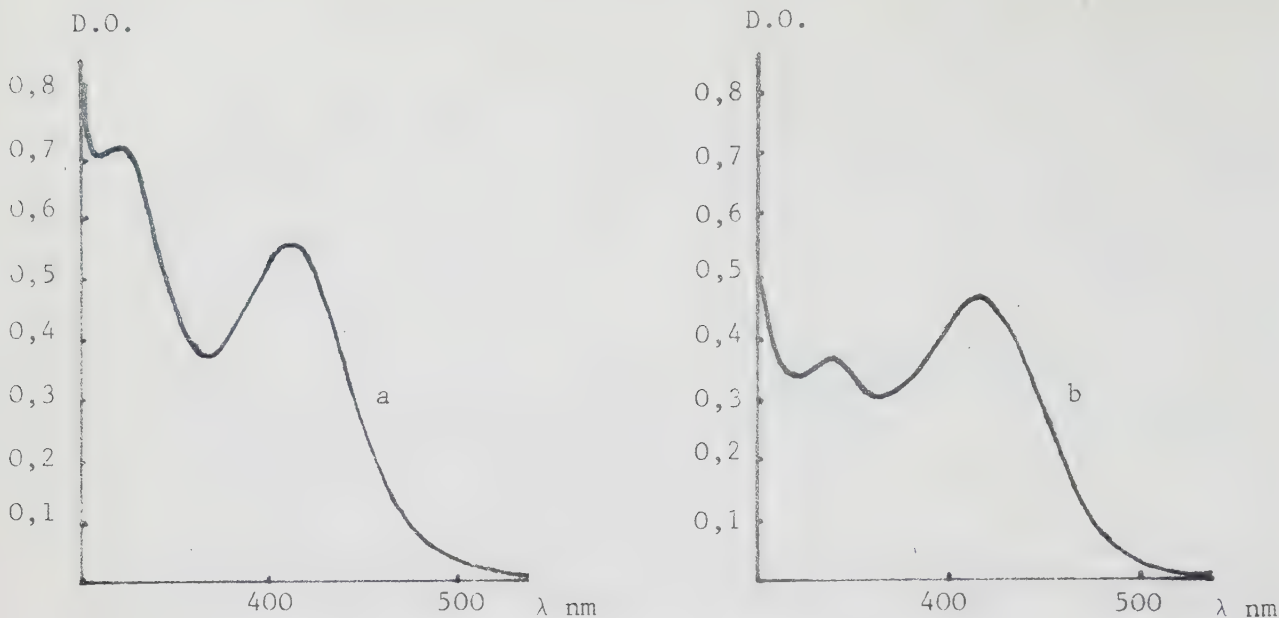


Fig. 37 - Formation d'holoenzyme à partir de Tsase β_2 et d'INHPLP -

spectre a : TSase β_2 dialysée contre de l'INHPLP 10^{-4} M, de la L-sérine 10^{-2} M et du β -ME 10^{-2} M - Protéines = 18 mg/ml.

spectre b : TSase β_2 dialysée contre du PLP 10^{-4} M et du β -ME 10^{-2} M - Protéines = 6,4 mg/ml

- Milieux tampons de phosphates $2 \cdot 10^{-1}$ M pH 7,8

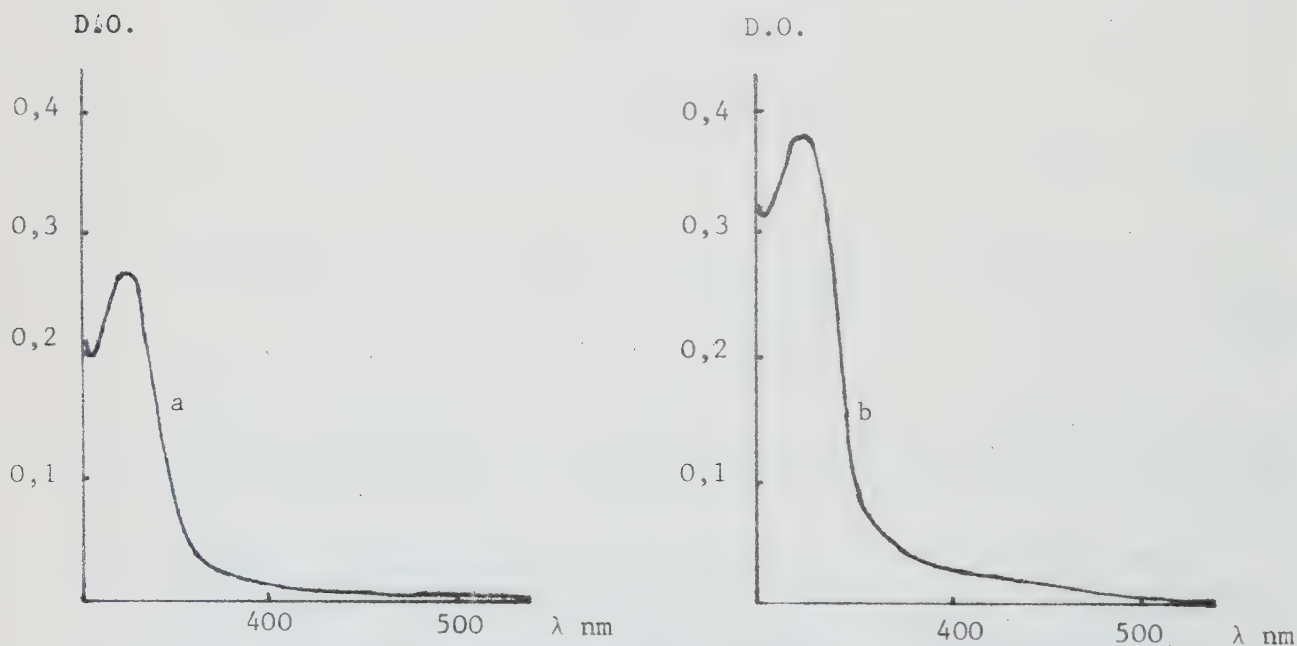


Fig. 38 - Spectres d'absorption de la TSase β_2 après action du BH_4Na -

spectre a : TSase β_2 traitée par le BH_4Na en présence d'INHPLP - protéines = 1,2 mg/ml

spectre b : TSase β_2 traitée par le BH_4Na en présence de PLP - Protéines = 2 mg/ml

- milieux tampons de phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,8

2ème expérience: inactivation de la TSase β_2 par le BH_4Na
en présence de PLP et d'INHPLP -

Nous avons fait agir le BH_4Na sur les milieux suivants:

	<u>milieu A</u>	<u>milieu B</u>
TSase β_2	$5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
L-sérine	10^{-2} M	10^{-2} M
indol	10^{-3} M	10^{-3} M
β -ME	10^{-2} M	10^{-2} M
PLP	10^{-3} M	
INHPLP		10^{-3} M

Le BH_4Na était ajouté aux milieux A et B au temps zéro de l'expérience puis à intervalles de temps réguliers: après 5, 15, 25, 35, 45 et 55 mn. L'activité enzymatique était mesurée sur des parties aliquotes prélevées au bout de 10, 20, 30, 40, 50 et 60 mn. En fin d'expérience, le milieu B demeurait coloré en jaune: cela indiquait qu'il renfermait encore de l'hydrazone non réduite (chapitre II: action du BH_4Na sur l'INHPLP)

Résultats - (fig. 39).

Après 10 mn, la TSase du milieu A est inactive et celle du milieu B a perdu les trois quarts de son activité. La TSase du milieu B devient ensuite de moins en moins active et finalement perd toute son activité.

Par conséquent dans les milieux A et B la TSase est sensible à l'action du BH_4Na . L'inactivation dans le milieu B est seulement retardée.

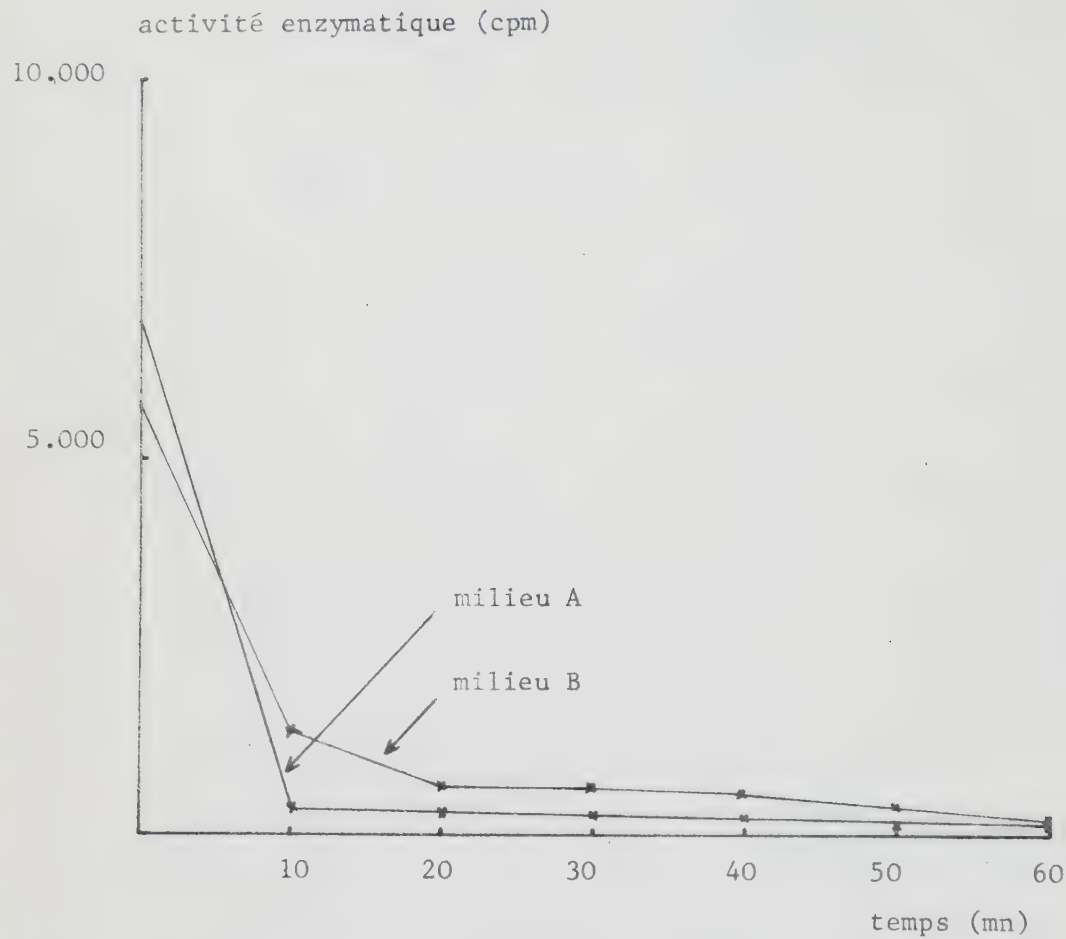


Fig. 39 - Inactivation de la TSase β_2 par le BH_4Na -

- La Tsase β_2 ($5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) est traitée par le BH_4Na en présence de PLP 10^{-3} M (milieu A) et d'INHPLP 10^{-3} M (milieu B) à la température du laboratoire.
- L'activité enzymatique, exprimée en cpm, correspond au tiers de la quantité de L-tryptophane synthétisé en 30 mn à 37°C .

3ème expérience: disparition de l'absorption à 415 nm de la TSase β_2 après action du BH_4Na en présence d'INHPLP et de substrats -

Nous avons fait agir le BH_4Na sur la TSase β_2 partiellement privée de PLP et additionnée:

d'INHPLP		10^{-3}M
de L-sérine		10^{-2}M
d'indol		10^{-3}M
de $\beta\text{-ME}$		10^{-2}M

Le BH_4Na était ajouté au milieu à intervalles de temps réguliers pendant 60 mn. Le milieu demeurait coloré en jaune (présence d'hydrazone non réduite).

Le milieu était ensuite dialysé contre du tampon de phosphates 5.10^{-2}M pH 7,8 et son spectre d'absorption était enregistré contre le tampon de dialyse.

Résultats - (fig. 38).

Le spectre du milieu dialysé ne présente pas d'absorption à 415 nm. (spectre a)

Seul un maximum à 330 nm est présent. Le spectre est identique à celui de l'holoenzyme traité par le BH_4Na . (spectre b)

En conclusion, au cours des réactions enzymatiques catalysées par la TSase β_2 , l'INHPLP se dissocie: le PLP libéré est fixé à la protéine par une liaison imine qui absorbe à 415 nm et qui peut être réduite par le BH_4Na . La fixation a lieu au niveau des sites spécifiques puisque le traitement par le BH_4Na entraîne la perte de l'activité enzymatique.

Ainsi le PLP provenant de l'hydrolyse de l'INHPLP est responsable de l'activation de la TSase. Ce cas est-il général ? une autre hydrazone de PLP en présence d'une autre enzyme doit-elle son activité coenzymatique à sa dissociation ?

Nous avons étudié le comportement de la benzylhydrazone de PLP, de même que celui de l'INHPLP, en présence de DOPA décarboxylase. Cette étude a été réalisée en traitant l'enzyme par le BH_4Na en présence de ces hydrazones.

c) Inactivation de la DOPA décarboxylase par le BH_4Na en présence d'hydrazones de PLP →

Avant de décrire les expériences, rappelons que:

- le PLP qui active la DOPA décarboxylase est fixé à la chaîne protéique par une liaison aldimine réductible par le BH_4Na ,
- le traitement par le BH_4Na entraîne la perte de l'activité enzymatique par blocage du site actif,
- la vitesse de décarboxylation est maximale seulement en présence d'un excès de PLP (7) ce qui laisse supposer que le PLP est renouvelé au cours de la catalyse.

Pour étudier l'action du BH_4Na sur la DOPA décarboxylase, nous avons utilisé des préparations enzymatiques privées de PLP par contact avec de la cystéine (chapitre III). Bien que la résolution fut incomplète, nous désignerons ces préparations par le mot: apoenzyme.

Nous avons réalisé trois séries d'expériences. Nous avons fait agir le BH_4Na sec (0,2 mg/ml) pendant 10 mn à 5°C sur:

- l'apoenzyme
- l'holoenzyme = apoenzyme + PLP
- l'apoenzyme saturé d'INHPLP ou de benzylhydrazone de PLP.

L'holoenzyme et les préparations saturées d'hydrazone étaient obtenues en mettant en contact pendant 60 mn à 5°C de l'apodécarboxylase avec soit du PLP, soit de l'hydrazoné: 0,2 μ mole d'effecteur pour un volume d'extrait catalysant la décarboxylation de 1 à 3 μ moles de DOPA en 5 mn. La concentration de l'effecteur dans le milieu était égale à : 1 à 6.10^{-4} M.

Certains essais étaient effectués en faisant agir le BH_4Na sur l'holoenzyme ou sur les préparations saturées d'hydrazoné *en présence de substrat*. La DOPA était alors ajoutée au milieu quelques minutes (5 à 10) avant l'addition de BH_4Na . Elle était en quantité suffisante pour que la vitesse de réaction soit maximale: 6 à 7.10^{-3} M.

Les milieux traités par le BH_4Na étaient ensuite filtrés sur gel de sephadex G-25 pour isoler les protéines des effecteurs et du substrat. La filtration était faite en tampon de phosphates 5.10^{-2} M pH 7,4.

L'activité des protéines recueillies était mesurée en présence d'un excès de PLP (8.10^{-5} M) sauf dans un essai où l'activité des protéines non filtrées était déterminé sans addition de PLP.

Résultats- (tableau 29).

L'apoenzyme, traitée par le BH_4Na , perd environ 45 p. 100 de son activité. On peut attribuer cette perte d'activité d'une part à la résolution incomplète de l'enzyme et d'autre part à l'action dénaturante du BH_4Na (103).

L'holoenzyme, par contre, n'est pas complètement inactivé par le BH_4Na . Il conserve en moyenne 20 à 30 p. 100 de son activité.

L'apoenzyme saturé d'INHPLP perd 60 à 70 p. 100 de son activité après traitement par le BH_4Na .

L'apoenzyme saturé de benzylhydrazoné de PLP perd en moyenne la moitié de son activité.

On constate que l'apoenzyme saturé d'INHPLP se comporte comme l'holoenzyme. On en déduit que l'hydrazoné est instable et que l'holoenzyme est apparu dans le milieu.

Ce résultat confirme celui obtenu avec la TSase B_2 .

Tableau 29.

Action du BH_4Na sur la DOPA décarboxylase

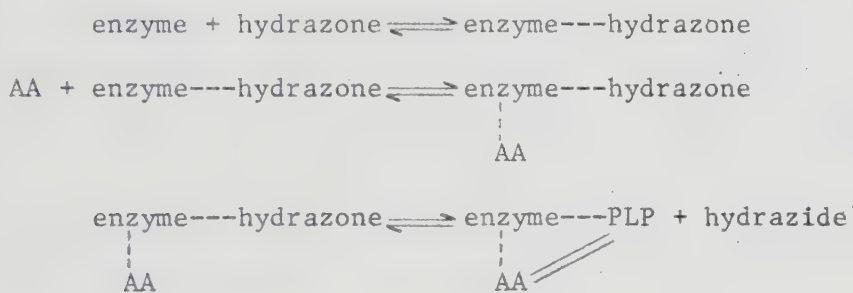
	QCO_2^* avant action du BH_4Na	QCO_2 après action du BH_4Na	activité résiduelle p. 100
apoenzyme	49 59 31,3 35 32,6 32,6 32,6 93 93 40,8	25,5 16 17 16,7 18 15,5 25,2 60 54 27	52 27 54 48 55 47,5 77 65 58 66
holoenzyme	49 (a) 35 40,8 32 32 93 (b) 93	0 5,5 9 9,1 9,7 18,7 17,4	0 16 22 28 30 20 19
apoenzyme + INHPLP	59 31,3	17,4 11,5	29 37
apoenzyme + benzylhydrazone de PLP	32,6 (c) 32,6 32,6 (d) 32,6 18 (e)	16 13,8 18,1 19,2 10	49 42,5 55 59 55

BH_4Na : 0,2 mg/ml de préparation enzymatique - temps : 10 mn -
température : 0 à 5°C - pH : 7,4

(a) : holoenzyme seul, (b) : holoenzyme + DOPA, (c) : apoenzyme + benzylhydrazone de PLP, (d) : apoenzyme + benzylhydrazone de PLP + DOPA, (e) : apoenzyme + benzylhydrazone de PLP, dans cet essai l'activité, après action du BH_4Na , est mesurée directement sans filtration préalable des protéines et sans addition de PLP.

* QCO_2 : activité spécifique mesurée en présence d'un excès de PLP ($8 \cdot 10^{-5}\text{M}$) et exprimée en n moles CO_2 /mg de protéines/mn.

En ce qui concerne l'apoenzyme saturé de benzylhydrazone de PLP, il se comporte comme l'apoenzyme seul: il conserve la moitié de son activité (c) (e) même après traitement par le BH_4Na en présence de substrat (d). Ces résultats suggèrent qu'aucune liaison susceptible d'être réduite par le BH_4Na ne se forme mais ils ne prouvent pas que l'hydrazone agit sans se dissocier. En effet, le processus suivant pourrait avoir lieu: l'hydrazone serait stable en présence d'enzyme et se fixerait sur l'apoenzyme par sa partie pyridoxalique. Le reste phosphorique, l'hydroxyle phénolique ou l'azote pyridinique pourraient être responsables de cette fixation (77). Ensuite, l'hydrazone réagirait avec l'acide aminé substrat lié à l'apoenzyme pour donner directement le complexe formé entre l'enzyme et la base de Schiff du PLP avec l'acide aminé tandis que l'hydrazide serait libéré dans le milieu. Ainsi à aucun moment le PLP ne serait lié à l'apoenzyme par une liaison aldimine et le BH_4Na serait sans action sur l'activité enzymatique :

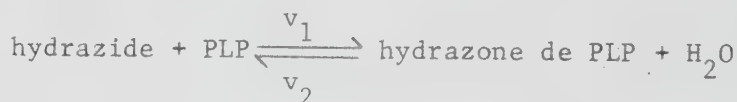


En conclusion, l'étude de la stabilité de l'INHPLP et de la benzylhydrazone de PLP en présence d'enzyme a montré que les hydrazones de PLP se dissocient au cours de la réaction enzymatique et que l'activation de l'enzyme est due au PLP régénéré.

3ème Partie - LA DISSOCIATION DE L'INHPLP, AU COURS D'UNE REACTION
ENZYMATIQUE, EST-ELLE CATALYSEE PAR L'ENZYME ?

D'après les expériences précédentes, les hydrazones de PLP doivent leur rôle coenzymatique au PLP qu'elles libèrent en se dissociant. Certaines ont une activité égale à celle du PLP même lorsque celui-ci se comporte comme un substrat et qu'il est renouvelé à la surface de l'enzyme au cours de la réaction enzymatique (cas de l'INHPLP et de la TSase β_2). Il est donc nécessaire que la dissociation des hydrazones soit rapide.

Nous ne connaissons pas les valeurs des vitesses v_1 et v_2 des deux réactions de l'équilibre :



et par conséquent nous ignorons si l'hydrolyse de la molécule a lieu rapidement. Par contre nous avons déterminé la vitesse apparente de dissociation de l'INHPLP et nous avons constaté qu'elle est accélérée par la présence de composés aminés dans le milieu.

Nous avons pensé que les protéines enzymatiques peuvent également catalyser l'hydrolyse de l'hydrazone par l'intermédiaire de leurs groupes $-\text{NH}_2$ libres.

Cette hypothèse a, du reste, été émise par Braunstein au congrès sur la catalyse pyridoxalique (Rome 1962).

On peut supposer que les molécules d'hydrazone se fixent sur les sites spécifiques de l'enzyme par leur partie pyridoxalique et que, par la suite, les restes hydrazidiques sont déplacés par les groupes aminés libres de l'enzyme qui se lient, sous forme d'imines, aux molécules de PLP régénéré.

Nous avons étudié l'action de la TSase β_2 sur la dissociation de l'INHPLP. Nous avons choisi cette enzyme parce qu'elle catalyse des réactions qui nécessitent une rotation du PLP et que, de ce fait, la dissociation de l'INHPLP doit être rapide pour que la vitesse de la réaction enzymatique soit maximale.

1ère expérience : dissociation de l'INHPLP marquée au ^{14}C
en présence de TSase β_2^-

Nous avons étudié l'action de la TSase β_2 sur la dissociation de l'INHPLP marquée au ^{14}C dans sa partie hydrazidique. L'hydrazone était en solution dans du tampon de phosphates 5.10^{-2}M pH 7,8.

Nous avons suivi cette dissociation en mesurant la radioactivité de l'hydrazone et de l'hydrazide présents dans le milieu (milieu 1) selon la technique décrite au paragraphe d de la première partie de ce chapitre.

Le milieu était maintenu à 37°C pendant 120 mn. Des parties aliquotes étaient prélevées toutes les 30 mn. Le milieu contenait de la TSase ($1,5.10^{-6}\text{M}$), de la L-sérine (10^{-2}M) et de l'indol (10^{-3}M). La concentration de l'INHPLP était égale à 2.10^{-5}M , concentration voisine de celle du Km.

En même temps, nous avons suivi la dissociation de l'hydrazone en présence de L-sérine (milieu 2), en présence de TSase non additionnée de substrat (milieu 3) et en l'absence d'enzyme et de substrat (milieu 4).

Tous les milieux contenaient du β ME (10^{-2}M).

Résultats - (fig. 40)

Les courbes représentant les pourcentages d'hydrazone marquée non dissociée en fonction du temps dans le milieu 1 et dans le milieu 2 sont identiques. Il en est de même pour les courbes correspondant aux milieux 3 et 4.

La TSase ne favorise pas la dissociation de l'hydrazone. Seule la sérine a une action. En effet, la dissociation est plus rapide dans les milieux 1 et 2 où la sérine est présente.

Nous avons déterminé la vitesse initiale de dissociation de l'INHPLP, en solution dans du tampon de phosphates 5.10^{-2}M pH 7,8, en présence de TSase β_2 additionnée de L-sérine, selon la technique décrite au paragraphe e de la première partie de ce chapitre. Le milieu, maintenu à 37°C pendant 3 h, renfermait :

de l'INHPLP	$3.10^{-5}M$
de la TSase β_2	$0,6.10^{-6}M$
de la L-sérine	$5,4.10^{-2}M$

Les spectres d'absorption étaient enregistrés contre du tampon de phosphates $5.10^{-2}M$ pH 7,8 contenant de la TSase β_2 $0,6.10^{-6}M$.

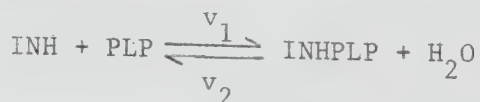
Dans ces conditions la vitesse initiale de dissociation de l'INHPLP est égale à $8,9.10^{-9}M.s^{-1}$. Cette valeur est très proche de celle mesurée en présence de L-sérine seule (tableau 27).

L'enzyme est donc sans action sur la dissociation de l'hydrazone.

Nous avons confirmé ce résultats en réalisant l'expérience suivante.

2ème expérience : disparition de l'INHPLP marquée au ^{14}C dans un milieu contenant un excès d'INH non marqué et de la TSase β_2

L'étude de la disparition de l'INHPLP marquée dans un milieu contenant un excès d'INH non marqué nous avait permis de mettre en évidence l'équilibre qui existe entre : hydrazone, hydrazide et PLP (paragraphe d, 1ère partie de ce chapitre) :



Nous avions constaté que la vitesse de disparition de l'INHPLP marquée dépend de la concentration de l'INH non radioactif dans le milieu. La formation de l'hydrazone radioactive à partir des produits de dissociation est en effet inhibée par la compétition entre l'hydrazide radioactif libéré et l'hydrazide non radioactif en excès.

Dans l'expérience présente nous avons recherché si la TSase accélérerait la disparition de l'hydrazone radioactive afin de savoir si l'enzyme augmente les échanges entre hydrazone radioactive et hydrazide non radioactif.

Nous avons mesuré la disparition de l'INHPLP marquée au ^{14}C dans les milieux suivants :

	milieu 1	milieu 2
INHPLP (^{14}C -2)	2.10^{-5}M	2.10^{-5}M
INH non marqué	2.10^{-4}M	2.10^{-4}M
L-sérine	10^{-2}M	10^{-2}M
β -ME	10^{-2}M	10^{-2}M
indol	10^{-3}M	10^{-3}M
TSase β_2	5.10^{-6}M	0

La présence de L-sérine et d'indol dans le milieu 1 avait pour but de placer l'enzyme dans des conditions d'action catalytique. Nous avons vérifié que l'INH n'inhibait pas complètement la réaction enzymatique.

Les milieux étaient maintenus à 37°C pendant 120 mn. Les techniques utilisées pour séparer l'hydrazone et l'hydrazide et pour mesurer leur radioactivité étaient les mêmes que celles décrites au paragraphe d de la 1ère partie de ce chapitre.

Résultats -

Les courbes représentant les pourcentages d'hydrazone marquée dans les deux milieux en fonction du temps sont les mêmes. Elles correspondent aux courbes 1 et 2 de la figure 40.

La TSase β_2 n'augmente pas les échanges entre l'hydrazone marquée et l'hydrazide non marqué et par conséquent elle n'exerce aucune action sur les vitesses v_1 et v_2 .

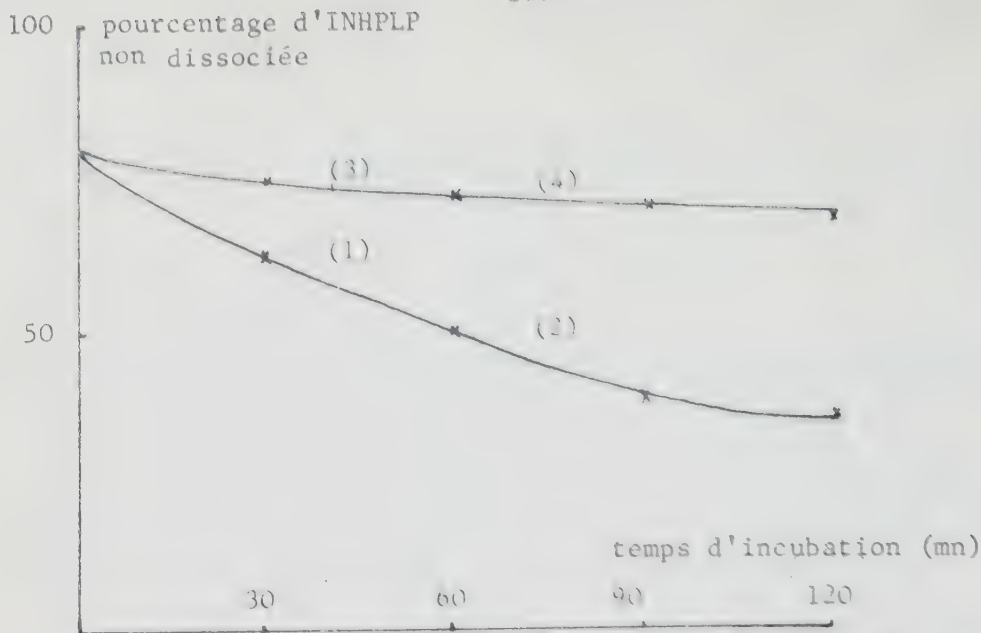


Fig. 40.- Dissociation de l'INHPLP marquée au ^{14}C en présence de TSase β_2 à 37°C .

milieu 1 : INHPLP $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$ + L-sérine 10^{-2}M + Indol 10^{-3}M + TSase $1,5 \cdot 10^{-6}\text{M}$

milieu 2 : INHPLP $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$ + L-sérine 10^{-2}M

milieu 3 : INHPLP $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$ + TSase $1,5 \cdot 10^{-6}\text{M}$

milieu 4 : INHPLP $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$

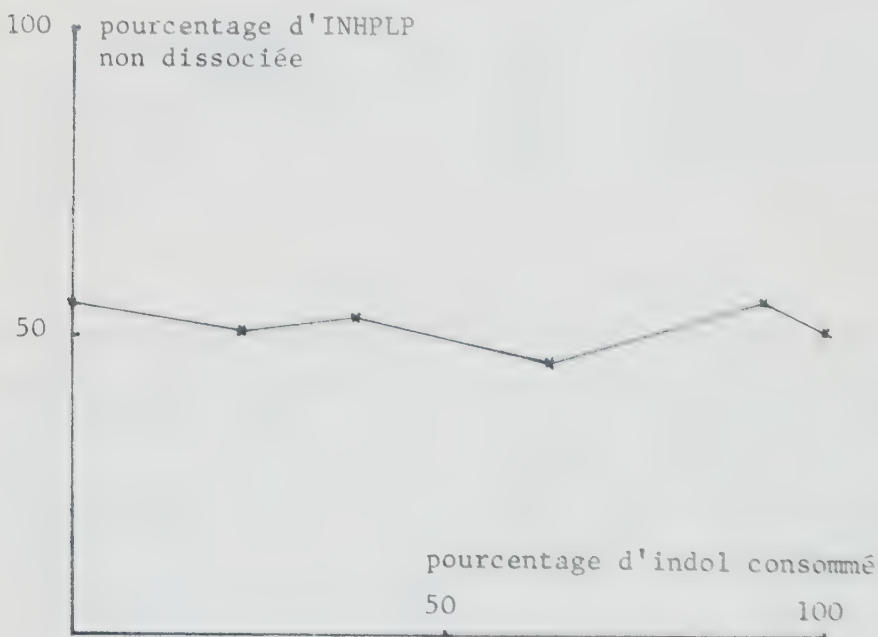


Fig. 41.- Dissociation de l'INHPLP marquée au ^{14}C en fonction de l'indol consommé.

Les milieux de réaction renferment : INHPLP $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$ + L-sérine 10^{-2}M + Indol 10^{-3}M + TSase β_2 : 0, 15, 30, 60, 90 et 120 μl .

Les milieux sont maintenus à 37°C pendant 60 mn.

3ème expérience : dissociation de l'INHPLP marquée au ^{14}C
en fonction de l'intensité de la réaction
enzymatique -

Cette expérience nous a permis de vérifier que la dissociation de l'INHPLP est indépendante de l'intensité de la réaction enzymatique.

Nous avons mesuré la quantité d'indol consommé et la quantité d'hydrazone non dissociée, pendant 60 mn à 37°C, dans des milieux contenant :

de l'INHPLP (^{14}C -2)	2.10^{-5}M
de la L-sérine	10^{-2}M
de l'indol	10^{-3}M
du β -ME	10^{-2}M
de la TSase β_2	en quantités croissantes.

Résultats - (fig. 41)

Dans tous les milieux, y compris le milieu témoin qui ne renfermait pas d'enzyme, la quantité d'hydrazone non dissociée est la même. Elle est égale à celle mesurée en présence de L-sérine 10^{-2}M seule (fig. 33)

Ainsi la dissociation de l'INHPLP dépend uniquement de la concentration en L-sérine du milieu.

En conclusion, l'enzyme est sans action sur la dissociation de l'hydrazone de PLP. L'acide aminé substrat contribue seul à modifier la stabilité de l'hydrazone.

4ème partie - VARIATION DU K_m DE L'INHPLP, DANS LA SYNTHÈSE ENZYMATIQUE
DU L-TRYPTOPHANE, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE LA
L-SÉRINE

L'INHPLP doit son activité coenzymatique à sa dissociation qui elle-même est fonction de la concentration de la L-sérine dans le milieu. Si la L-sérine est le facteur principal de la dissociation de l'hydrazone, l'affinité de celle-ci pour l'enzyme doit dépendre de la concentration de l'acide aminé dans le milieu de réaction. Pour le vérifier nous avons déterminé la constante de Michaelis (K_m) de l'INHPLP dans la réaction :



à différentes concentrations de L-sérine.

Nous avons utilisé de la TSase β_2 dialysée contre du tampon de phosphates $5.10^{-2}M$ pH 7,8 contenant du β -ME $10^{-2}M$, pendant 15 heures à une température voisine de $5^\circ C$. Les mesures d'activité enzymatique étaient effectuées en tampon de phosphates $5.10^{-2}M$ pH 7,8. Les milieux de réaction contenaient :

de la TSase β_2		$2.10^{-6}M$	
de l'indol		$10^{-3}M$	
du β -ME		$10^{-2}M$	
de la L-sérine		$10^{-2}M$	(milieu 1)
		$5.10^{-3}M$	(milieu 2)
		$10^{-3}M$	(milieu 3)
		$5.10^{-4}M$	(milieu 4)
de l'INHPLP		de $0,25.10^{-5}M$ à $20.10^{-5}M$	

La vitesse de la réaction enzymatique était exprimée en cpm. Elle représentait le tiers de la radioactivité du L-tryptophane synthétisé en 30 mn à $37^\circ C$.

Résultats - (fig. 42)

Les graphiques 1, 2, 3, 4 donnent, selon la représentation de Lineweaver-Burk, les résultats obtenus avec les milieux 1, 2, 3 et 4.

Dans le cas du milieu 1, renfermant de la L-sérine $10^{-2}M$, le tracé est linéaire. Le K_m de l'hydrazone est égal à $0,6 \cdot 10^{-5}M$.

En présence de L-sérine $5 \cdot 10^{-3}M$ (graphique 2) le tracé est légèrement courbe. Le K_m de l'hydrazone peut être estimé à $0,67 \cdot 10^{-5}M$.

Avec les milieux 3 et 4, on obtient des courbes. Les points d'intersections des courbes avec l'axe des abscisses correspondent à des K_m respectivement égaux à $3 \cdot 10^{-5}M$ (milieu 3) et $4 \cdot 10^{-5}M$ (milieu 4).

Les courbes 3 et 4 peuvent être décomposées en deux parties :

une partie correspondant aux faibles concentrations d'INHPLP (a),

une partie correspondant aux fortes concentrations d'INHPLP (b).

Si on trace la tangente à la partie a de la courbe et si on la prolonge jusqu'à l'axe des abscisses on obtient au point d'intersection une deuxième valeur du K_m qui est la même pour les deux milieux:

K_m (faibles concentrations d'INHPLP) = $0,5 \cdot 10^{-5}M$. Cette valeur est proche de celles obtenues en présence de L-Sérine $10^{-2}M$ et $5 \cdot 10^{-3}M$ qui sont elles-mêmes voisines de la valeur du K_m du PLP.

Ces résultats indiquent que *l'affinité apparente* de l'hydrazone dépend de la *concentration de la L-sérine* dans le milieu. Le K_m de l'INHPLP varie en fonction de cette concentration : quand la teneur du milieu en acide aminé diminue, le K_m de l'INHPLP augmente (fig. 43).

Cependant un deuxième facteur intervient. Il s'agit de la concentration de l'hydrazone. En effet, quand l'INHPLP est en solution très diluée sa dissociation est élevée et par conséquent son *affinité apparente* est grande.

Ainsi dans un milieu contenant même peu de L-sérine ($10^{-3}M$ ou $5 \cdot 10^{-4}M$), le K_m de l'INHPLP est voisin de celui du PLP quand la concentration de l'hydrazone est basse.

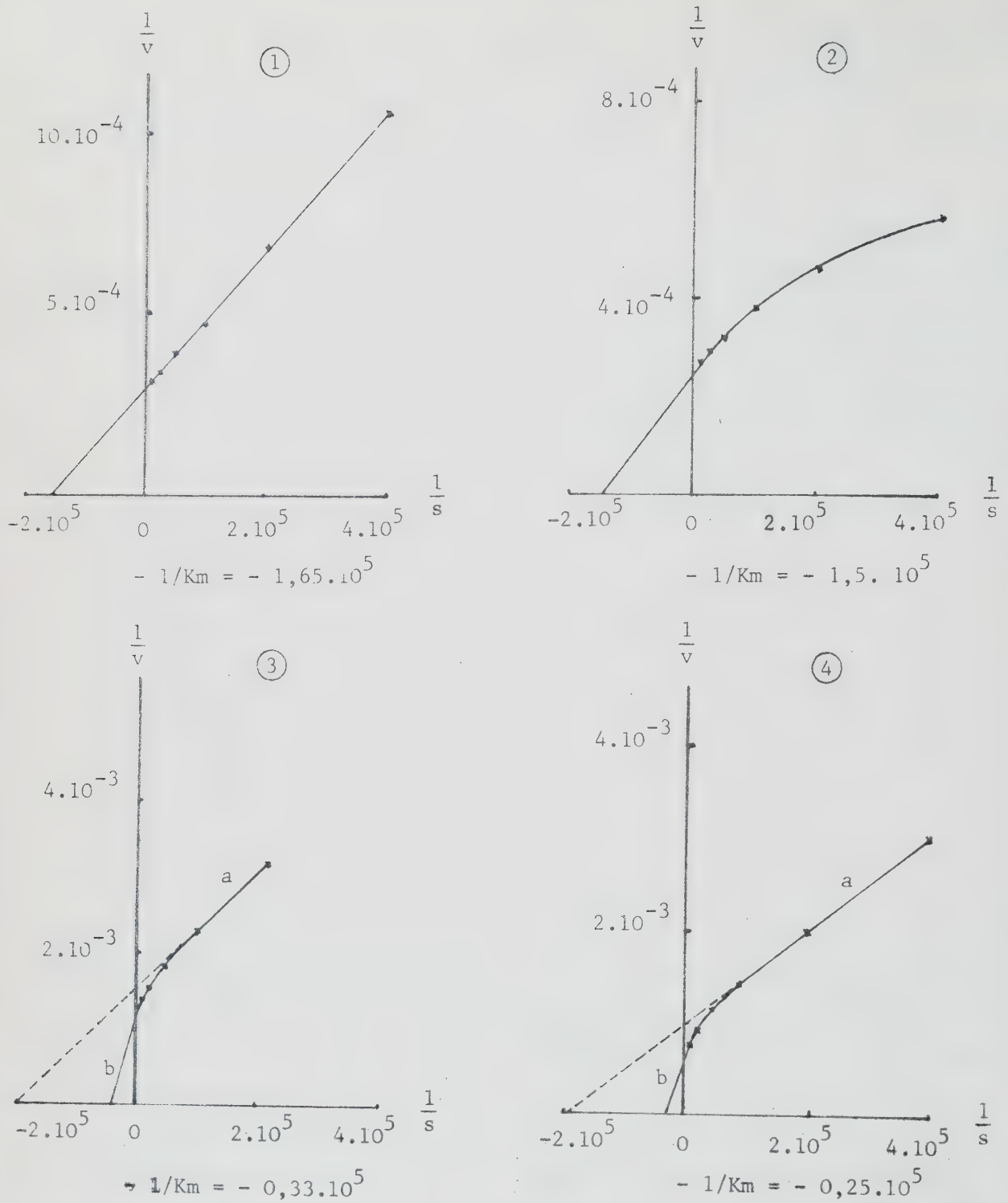


Fig. 42 - Détermination du K_m de l'INHPLP en présence de L-sérine : $10^{-2} M$ ①, $5 \cdot 10^{-3} M$ ②, $10^{-3} M$ ③ et $5 \cdot 10^{-4}$ ④

v : vitesse de la réaction enzymatique exprimée en cpm

s : concentration de l'INHPLP exprimée en mole/litre

En conclusion, l'affinité apparente de l'hydrazone de PLP pour l'enzyme est fonction de la dissociation de la molécule qui elle-même dépend de la concentration de l'hydrazone et de celle de l'acide aminé substrat.

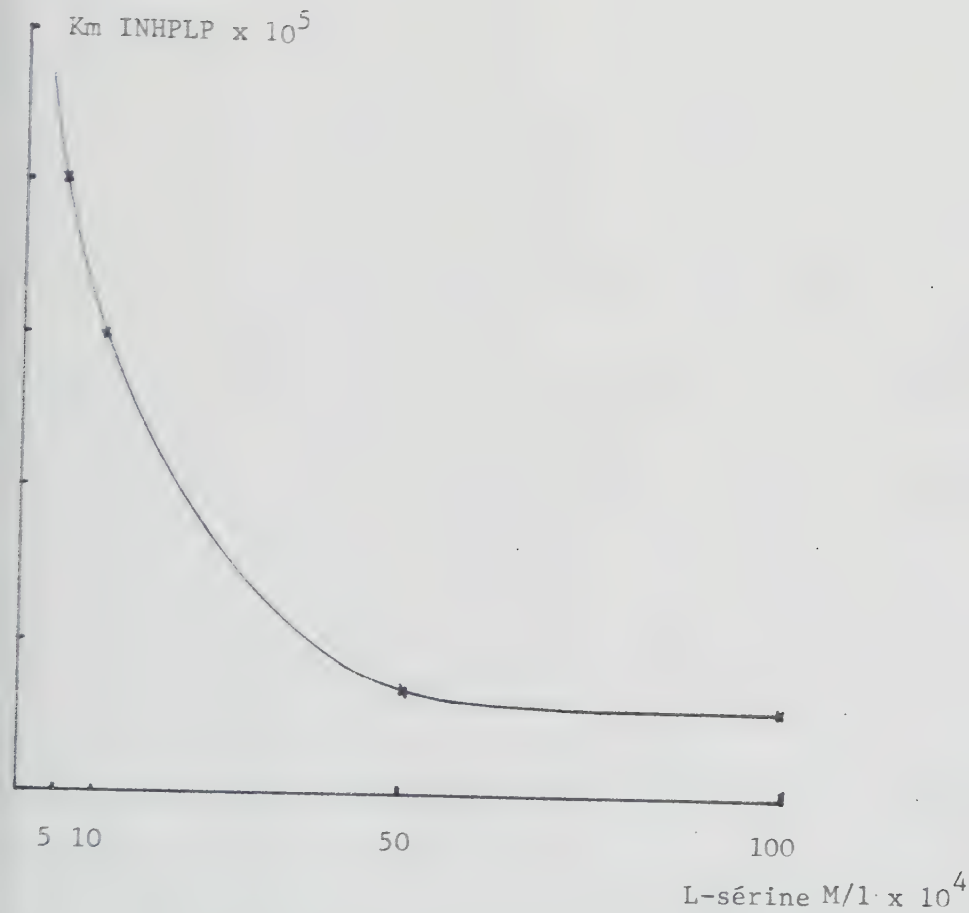


Fig. 43.- Variation du K_m de l'INHPLP en fonction de la concentration de la L-sérine.

Conclusion

Dès les premières recherches entreprises sur le rôle coenzymatique de l'INHPLP, l'intérêt que présentait l'étude du comportement des dérivés du PLP au cours des réactions enzymatiques est clairement apparu: la connaissance de leur mécanisme d'action permettrait de confirmer ou d'infirmer la théorie du fonctionnement du PLP.

Avant que nous commencions notre travail, deux théories avaient été formulées: *ou bien les dérivés agissent par eux-mêmes ou bien ils doivent leur activité au PLP libéré par hydrolyse de leur molécule.*

Un certain nombre de faits expérimentaux étaient en faveur de la première hypothèse et représentaient autant d'arguments contre le rôle de la fonction aldéhyde du PLP au cours de la catalyse pyridoxalique (51). Les hydrazones de PLP apparaissaient comme des composés stables. Leur activité coenzymatique était dans certains cas supérieure à celle du PLP. Les hydrazides, par contre, étaient connus pour être des inhibiteurs des enzymes activées par le PLP et il était difficile d'admettre que l'activité coenzymatique des hydrazones était due à une scission de leur molécule libérant à la fois le PLP et un hydrazide. D'autant plus qu'il semblait possible que les hydrazides exercent leur action inhibitrice directement sur les apoenzymes: un hydrazide, l'isopropylisoniazide, substitué à l'azote donc ne réagissant pas avec le PLP, s'était révélé un puissant inhibiteur de la DOPA décarboxylase et en outre l'INH inhibait des enzymes non pyridoxaliques.

En ce qui concernait la deuxième hypothèse, bien que la formation d'enzyme-PLP ait été mise en évidence, la preuve que les hydrazones de PLP devaient leur activité à leur instabilité n'avait pas été faite.

Nous avons donc étudié les caractères de l'activité coenzymatique des dérivés du PLP, leur stabilité et leur comportement au cours des réactions enzymatiques.

De l'étude de l'activité coenzymatique des dérivés du PLP sur les *cyclodextrine-enzyme*, il ressort que les *hydrazones* de PLP ont une action égale à celle du PLP mais que par contre leur période d'incubation avec l'apoenzyme, lorsqu'elle est nécessaire pour obtenir l'activité enzymatique maximale, est plus longue que celle du PLP.

Les imines de PLP sont des activateurs au moins aussi efficaces que le PLP et leur période d'incubation avec l'apoenzyme est égale à celle du PLP.

Ces résultats n'apportent pas d'éléments permettant de déduire un mécanisme d'action concernant les hydrazones de PLP. Ils indiquent seulement que des dérivés instables: imines de PLP, ont un comportement analogue à celui du coenzyme naturel.

L'étude de la stabilité de l'INHPLP et de la semicarbazone de PLP montre que ces dérivés sont en équilibre avec leurs constituants en solution aqueuse neutre:



Le degré de dissociation des hydrazones dépend de leur concentration initiale, la dilution favorisant l'hydrolyse.

En présence de composés aminés, l'équilibre suivant apparaît:



Cet équilibre s'établit plus rapidement que le précédent et la proportion d'hydrazone dissociée y est plus grande.

L'existence d'un équilibre entre hydrazone, PLP et hydrazide supprime la contradiction qui existait entre l'activité coenzymatique des hydrazones et le pouvoir inhibiteur des hydrazides. En effet, en solution diluée les hydrazones sont partiellement dissociées: le PLP est libéré et l'enzyme activée; en présence d'un excès d'hydrazide, le PLP est masqué sous forme d'hydrazone non dissociée et l'enzyme n'est pas activée.

L'influence des composés aminés sur la dissociation des hydrazones laisse prévoir que les acides aminés substrats interviennent dans le mécanisme d'action de ces dérivés.

L'étude du comportement de l'INHPLP et de la benzylhydrazoné de PLP en présence d'enzymes et pendant la catalyse enzymatique prouve que les hydrazones doivent leur activité au PLP qu'elles libèrent. *Au cours d'une réaction catalysée par une enzyme additionnée d'hydrazoné, il apparaît de l'enzyme-PLP qui est responsable de la catalyse.* En effet, si l'on empêche l'enzyme-PLP de fonctionner en faisant agir du BH_4Na sur le milieu, on arrête la réaction.

Cependant, il n'est pas exclu que dans certains cas les hydrazonés se fixent sur les sites actifs des enzymes et qu'elles réagissent avec le substrat pour donner directement le complexe enzyme-PLP-substrat. Quoi qu'il en soit, la dissociation des hydrazonés de PLP est à l'origine de leur activité coenzymatique.

Ainsi les résultats obtenus en étudiant la stabilité des hydrazonés de PLP en l'absence et en présence d'enzyme sont en faveur de la deuxième hypothèse concernant le mécanisme d'action des dérivés du PLP.

Un point restait à expliquer: comment la dissociation pouvait-elle avoir lieu assez rapidement pour que l'activité de certaines hydrazonés soit égale à celle du PLP.

Nous avons étudié l'action de l'enzyme et celle du substrat sur la dissociation de l'INHPLP pendant la réaction enzymatique. Nous avons constaté que l'enzyme n'a pas d'influence sur la dissociation de l'INHPLP mais que le rôle du substrat est capital. *L'affinité apparente de l'hydrazoné pour l'enzyme dépend de la teneur en substrat du milieu de réaction.* Ainsi, dans la synthèse enzymatique du L-tryptophane, le K_m de l'INHPLP varie en fonction de la concentration de la L-sérine. Il est égal à $0,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en présence de L-sérine 10^{-2} M et six fois plus élevé en présence de L-sérine $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Ce rôle de l'acide aminé substrat est la conséquence de l'action que les composés aminés exercent sur la dissociation de l'hydrazoné. Du reste, la dilution modifie aussi l'affinité apparente de l'hydrazoné: en présence d'une faible concentration de L-sérine ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) le K_m de l'INHPLP est proche de $0,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ si la concentration de l'hydrazoné est suffisamment basse (de l'ordre de 10^{-6} M).

D'après nos résultats, le mécanisme d'action des hydrazones peut être le suivant:

l'hydrazone réagirait avec l'acide aminé substrat pour former une imine de PLP tandis que l'hydrazide serait libéré. L'imine de PLP constituerait le véritable substrat de la réaction enzymatique. La dissociation de l'hydrazone pourrait se produire soit dans le milieu soit à la surface de l'enzyme. Nous ne pensons pas que les $-NH_2$ libres de la protéine enzymatique aient une action sur la dissociation des dérivés du PLP comme l'affirment certains auteurs (4).

Le mécanisme que nous proposons est en accord avec la théorie de la catalyse pyridoxalique qui reconnaît à la base de Schiff formée entre le PLP et l'acide aminé substrat un rôle primordial.

Bibliographie

1. R.W. ALBERS et R.O. BRADY, J. Biol. Chem., 1959, 234, 926
2. D. AURES et W.G. CLARK, Anal. Biochem., 1964, 9, 35
3. D. AURES, R. FLEMING et R. HAKANSON, J. Chromatog., 1968, 33, 480
4. D. AURES, R. HAKANSON et C. WISEMAN, European J. Pharmacol., 1969, 8, 232
5. D. AURES et C. WISEMAN, Federation Proc., 1967, 26, 844
6. J. AWAPARA, T.L. PERRY, C. HANLY et E. PECK, Clin. Chim. Acta, 1964, 10, 286
7. J. AWAPARA, R.P. SANDMAN et C. HANLY, Arch. Biochem. Biophys., 1962, 98, 520
8. B.E.C. BANKS, A.J. LAWRENCE, E.M. THAIN et C.A. VERNON, J. Chem. Soc. G.B., 1963, 5799
9. B.E.C. BANKS et C.A. VERNON, J. Chem. Soc. G.B., 1961, 1698
10. J.P. BIEHL et R.W. VILTER, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1954, 85, 389
11. H. BLASCHKO, J. Physiol., 1939, 96, 50 p
12. H. BLASCHKO, J. Physiol., 1942, 101, 337
13. H. BLASCHKO, Biochem. J., 1949, 44, 268
14. H. BLASCHKO, C.W. CARTER, J.R.P. O'BRIEN et G.H. SLOANE-STANLEY, J. Physiol., 1948, 107, 18
15. H. BLASCHKO, P. HAGEN et A.D. WELCH, J. Physiol., 1955, 129, 27
16. H. BLASCHKO, P. HOLTON et G.H. SLOANE-STANLEY, J. Physiol., 1949, 108, 427
17. H. BLASCHKO et P. HOLTON, J. Physiol., 1950, 110, 482
18. D.F. BOGDANSKI, A. PLETSCHER, B.B. BRODIE et S. UDENFRIEND, J. Pharm. Exper. Therap., 1956, 117, 82
19. V. BONAVITA et V. SCARDI, IVe Intern. Congr. Biochemistry, 1958

20. V. BONAVIDA et V. SCARDI, *Biochem. Pharmacol.*, 1959, 2, 58
21. V. BONAVIDA et V. SCARDI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 82, 300
22. I.O. BOONE et K.T. WOODWARD, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1953, 84, 292
23. A.E. BRAUNSTEIN, *Advances in Enzymology*, Interscience Publishers, New York, 1957, 19, 335
24. A.E. BRAUNSTEIN et M.M. SHEMYAKIN, *Biokhimiya*, 1953, 18, 393
25. G.A. BRAY, *Anal. Biochem.*, 1960, 1, 279
26. P. CAMBON, Thèse Doc. Pharm., Montpellier, 1957
27. M. CAMIER et P. GONNARD, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, 50, 933
28. J. CARDOT, *C.R. Soc. Biol.*, 1966, 160, 798
29. J. CATTANEO-LACOMBE et J.C. SENEZ, *C.R. Soc. Biol.*, 1956, 150, 748
30. G. CHARLOT et D. BEZIER, *Méthodes Modernes d'Analyse quantitative Minérale*, 2ème édition, MASSON et Cie, Paris, 1949, 322
31. W.G. CLARK, D. AURES et C. WISEMAN, 1 meeting Intern. Soc. Neurochem., 1967, p. 39
32. C.T. CLARK, H. WEISSBACH et S. UDENFRIEND, *J. Biol. Chem.*, 1954, 210, 139
33. E.H. CORDES et W.P. JENCKS, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1962, 84, 826
34. I.P. CRAWFORD et D.A. WILSON, *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 4801
35. H.M. CURRY et W.A. BULEN, *J. Org. Chem.*, 1960, 25, 209
36. V.E. DAVIS et J. AWAPARA, *Federation Proc.*, 1960, 19, 5
37. V.E. DAVIS et J. AWAPARA, *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 124
38. A.N. DAVISON, *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 19, 66
39. A.N. DAVISON, *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 19, 131
40. D.J. DEMIS, H. BLASCHKO et A.D. WELCH, *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 1956, 117, 208
41. E. DEMOLE, *J. Chromatog.*, 1961, 6, 2
42. L.S. DIETRICH, *J. Biol. Chem.*, 1953, 204, 587
43. A.E. EVANGELOPOULOS et I.W. SIZER, *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 2983
44. J.H. FELLMAN, *Enzymologia*, 1959, 20, 366
45. M. FUJIOKA et E.E. SNELL, *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 3044

46. E.F. GALE, *Advances in Enzymology*, Interscience Publishers, New York, 1946, 6, 1
47. M. GOLBERG, Thèse Doc. Sci. Paris, 1967, p. 35
48. M. GOLBERG, Thèse Doc. Sci. Paris, 1967, p. 40
49. P. GONNARD, Thèse Doc. Sci., Paris, 1948, p. 44
50. P. GONNARD, C.R. Acad. Sci., 1958, 246, 3539
51. P. GONNARD, I.U.B. Symp. Ser., 1963, 30, 307
52. P. GONNARD et N. BOIGNE, Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 609
53. P. GONNARD et M. CAMIER, Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 225
54. P. GONNARD, M. CAMIER, N. BOIGNE, J. DUHAULT et Cl. NGUYEN-PHILLIPON, *Enzymologia*, 1965, 28, 211
55. P. GONNARD, M. CAMIER et Cl. NGUYEN-PHILIPPON, Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 323
56. P. GONNARD et J. DUHAULT, J. Neurochem., 1966, 13, 407
57. P. GONNARD, J. DUHAULT, M. CAMIER, Cl. NGUYEN-PHILIPPON et N. BOIGNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 81, 548
58. P. GONNARD, J. DUHAULT et S. FENARD, J. Neurochem., 1964, 11, 819
59. P. GONNARD, J. DUHAULT et Cl. NGUYEN-PHILIPPON, *Enzymologia*, 1967, 32, 182
60. P. GONNARD et S. FENARD, J. Neurochem., 1962, 9, 135
61. P. GONNARD et G. GLIKMAN, Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 501
62. P. GONNARD et J.P. NGUYEN CHI, Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 485
63. P. GONNARD et J.P. NGUYEN CHI, *Enzymologia*, 1959, 20, 237
64. P. GONNARD et Cl. NGUYEN-PHILIPPON, *Enzymologia*, 1959, 20, 231
65. P. GONNARD et Cl. NGUYEN-PHILIPPON, Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 601
66. P. GONNARD, J.C. ROUCAYROL, M. CAMIER et J. PERRIN, Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 481
67. D.E. GREEN, L.F. LELOIR et V. NOCITO, J. Biol. Chem., 1945, 161, 559
68. I.C. GUNSALUS et R.A. SMITH, *Methods in Enzymology*, 2ème édition, Academic Press, New York, 1957, 3, 963
69. P. HAGEN, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy, 1962, 18, 175

70. R.E. HANDSCHUMACHER et C.A. PASTERNAK, *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, 30, 451
71. M. HATANAKA, E.A. WHITE, K. HORIBATA et I.P. CRAWFORD, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, 97, 596
72. D. HEYL, E. LUR, S.A. HARRIS et K.J. FOLKERS, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1951, 73, 3430
73. D.S. HOARE, *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 19, 141
74. P. HOLTZ et K. CREDNER, *Arch. Exper. Path. Pharmacol.*, 1942, 199, 145
75. P. HOLTZ, R. HEISE et K. LÜDTKE, *Arch. Exper. Path. Pharmacol.*, 1938, 191, 87
76. R.C. HUGHES, W.T. JENKINS et E.H. FISCHER, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1962, 48, 1615
77. V.I. IVANOV et M. YA. KARPEISKY, *Advances in Enzymology*, Interscience Publishers, New York, 1969, 32, 21
78. W.P. JENCKS et E.H. CORDES, *I.U.B. Symp. Ser.*, 1963, 30, 57
79. W.T. JENKINS, *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 1121
80. W.T. JENKINS, D.A. YPHANTIS et I.W. SIZER, *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 51
81. W.T. JENKINS et I.W. SIZER, *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 620
82. K.F. KILLAM, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1957, 119, 263
83. K.F. KILLAM et J.A. BAIN, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1957, 119, 255
84. S.M. KLEIN et R.D. SAGERS, *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 206
85. Y. KOBAYASHI, *Anal. Biochem.*, 1963, 5, 284
86. R. KUNTZMAN, P.A. SHORE, D.F. BOGDANSKI et B.B. BRODIE, *J. Neurochem.*, 1961, 6, 226
87. P. LADURON et F. BELPAIRE, *Anal. Biochem.*, 1968, 26, 210
88. H. LANGEMANN, *Brit. J. Pharmacol.*, 1951, 0, 318
89. R.J. LEVINE et D.E. WATTS, *Biochem. Pharmacol.*, 1966, 15, 841
90. W. LOVENBERG, H. WEISSBACH et S. UDENFRIEND, *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 89
91. K. MAKINO, Y. OOI, M. MATSUDA, M. TSUJI, M. MATSUMOTO et T. KURODA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1962, 9, 246

92. K. MAKINO, Y. OOI, M. MATSUDA et T. KURODA, I.U.B. Symp. Ser., 1963, 30, 291
93. G.H. MASSIEU, R.I. TAPIA et B.G. ORTEGA, Biochem. Pharmacol., 1962, 11, 976
94. Y. MATSUO, J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 2011
95. J. MAURON et E. BUJARD, Bull. Soc. Chim. Belge, 1956, 65, 140
96. A. MEISTER, H.A. SOBER et E.A. PETERSON, J. Biol. Chem., 1954, 206, 89
97. L. MESTER, Dérivés hydraziniques des glucides, Hermann, Paris, 1967, p. 35
98. D.E. METZLER, J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 485
99. D.E. METZLER, M. IKAWA et E.E. SNELL, J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 648
100. C.J.O.R. MORRIS, J. Chromatog., 1964, 16, 167
101. R. MUNIER, Monographie de Chimie organique, LEDERER 1960, 3, vol. 2, p. 681, Masson et Cie, PARIS.
102. Y. MURAKAMI et K. MAKINO, The Journal of Vitaminology, 1966, 12, 263
103. J.S. NISHIMURA, J.M. MANNING et A. MEISTER, Biochemistry, 1962, 1, 442
104. D. PALM, Arch. Exper. Path. Pharmacol., 1958, 234, 206
105. D. PALM, C. ERNZERHOFF et P. HOLTZ, Arch. Exper. Path. Pharmacol., 1967, 258, 352
106. E.A. PETERSON, H.A. SOBER et A. MEISTER, J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 570
107. M. POLONOWSKI et P. GONNARD, C.R. Soc. Biol., 1947, 141, 1211
108. R. PLAN et M.T. FAYET, Ann. Biol. Clin., 1961, 1, 169
109. B. PULLMAN, I.U.B. Symp. Ser., 1963, 30, 103
110. R.S. de ROPP et A. FURST, Brain Research, 1966, 2, 323
111. F. ROSEN, Federation Proc., 1954, 13, 121
112. E. ROSENGREN, Acta Physiol. Scand., 1960, 49, 364
113. T.M. SABA et N.R. DI LUZIO, J. Lipid Res., 1966, 7, 566
114. O. SCHALES et S.S. SCHALES, Arch. Biochem., 1949, 24, 83
115. G. SCHEUERBRANDT, Anal. Biochem., 1965, 13, 475

16. H.F. SCHOTT et W.G. CLARK, J. Biol. Chem., 1952, 196, 449
17. C.E. SEKERIS, Z. Physiol. Chem., 1963, 332, 70
18. E.S. SEVERIN, N.N. GULYAEV, E.N. KHURS et R.M. KHOMUTOV, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 35,
19. O.H. SMITH et C. YANOFSKY, Methods in Enzymology, 1ère édition, Academic Press, New York, 1962, 5, 801
20. A.R. SOMERVILLE, Biochem. Pharmacol., 1964, 13, 1861
21. E. STAHL, Chem. Z., 1958, 82, 323
22. C. STREFFER, Biochim. Biophys. Acta, 1967, 139, 193
23. J.P. SUSZ, B. HABER et E. ROBERTS, Biochemistry, 1966, 5, 2870
24. R. TAPIA et J. AWAPARA, Biochem. Pharmacol., 1969, 18, 145
25. R. TAPIA, H. PASANTES, B.G. ORTEGA et G.H. MASSIEU, Biochem. Pharmacol., 1966, 15, 1831
26. R. TAPIA, M. PEREZ de la MORA et G.H. MASSIEU, Biochem. Pharmacol., 1967, 16, 1211
27. Y.M. TORCHINSKY, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 10, 401
28. W.W. UMBREIT, R.H. BURRIS et J.F. STAUFFER, Manometric techniques, 4ème édition, BURGESS Publishing Company, Minneapolis, 1964
29. R.W. VILTER, J.P. BIEHL, J.F. MUELLER et B.I. FRIEDMAN, Federation Proc., 1954, 13, 776
30. H. WACHSMUTH, Journal de Pharmacie de Belgique, 1953, 11-12, 561
31. H. WADA et E.E. SNELL, J. Biol. Chem., 1962, 237, 127
32. O. WARBURG et W. CHRISTIAN, Biochem. Z., 1941, 310, 384
33. E. WERLE et D. AURES, Z. Physiol. Chem., 1959, 316, 45
34. R.G. WIEGAND, J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78, 5307
35. M. YONEDA et N. ASANO, Science, 1953, 117, 277
36. M. YONEDA, N. KATO et M. OKAJIMA, Nature, 1952, 170, 803
37. A. YUWILLER, E. GELLER et S. EIDUSON, Arch. Biochem. Biophys., 1959, 80, 162
38. A. YUWILLER, E. GELLER et S. EIDUSON, Arch. Biochem. Biophys., 1960, 89, 143

Table des Matières

INTRODUCTION	1
Chapitre I : MATERIEL ET METHODES	10
Chapitre II : PREPARATION ET CARACTERES DES DERIVES DU PHOSPHO-5 PYRIDOXAL	22
- Hydrazidones de PLP	23
- Hydrazinones de PLP	31
- Imines et oxime de PLP	33
Chapitre III : DOPADECARBOXYLASE - DOSAGE ET PREPARATION ...	38
Mesure de l'activité de la DOPAdécarboxylase	40
<i>Dosage du O_2</i>	41
- Méthode manométrique	41
- Méthodes utilisant un substrat marqué au ^{14}C	46
- Méthode automatique	47
<i>Dosage de la dopamine</i>	52
Purification de la DOPAdécarboxylase	54
<i>Etape I : Extraction de l'enzyme</i>	55
- Matériel	55
- Mode opératoire	55
- Conservation de l'extrait	56
- Action du pH sur l'extrait	56
- Action de la dialyse sur l'extrait	56
<i>Etape II : Fractionnement des protéines de l'extrait</i>	59
- Fractionnement par la chaleur ..	59
- Fractionnement par un acide	59
- Fractionnement par le sulfate d'ammonium	62

Etape III : Enrichissement de la fraction active - Chromatographie sur DEAE-sephadex 64

- Expériences en cuve 66
- Expériences sur colonnes 66
- Caractères de la préparation obtenue . 69

Résolution de la DOPAdécarboxylase 71

Chapitre IV : ACTION DES DERIVES DU PLP SUR LES PYRIDOXALO-ENZYMES 73

- Isonicotylhydrazone de PLP 75
- Cyanacétylhydrazone de PLP 81
- Succinylhydrazone de PLP 81
- γ -Glutamylhydrazone de PLP 82
- Salicylhydrazone de PLP 84
- Semicarbazone de PLP et thiosemi-carbazone de PLP 84
- Hydrazone de PLP et azine de PLP 87
- Benzylhydrazone de PLP et N-méthyl-hydrazone de PLP 89
- Iodo-2 phénylimine de PLP 93
- Triazolylimine de PLP 98
- Oxime de PLP 102

Chapitre V : ETUDE DU MECANISME D'ACTION DES DERIVES DU PLP 107

1ère partie : Stabilité des hydrazones de PLP en solution aqueuse neutre et en l'absence de préparation enzymatique 110

- Recherche de l'INH dans une solution d'INHPLP 110
- Recherche du PLP dans une solution d'INHPLP 112
- Influence de la concentration de l'INHPLP sur sa propre dissociation . 113
- Mise en évidence de l'équilibre: INHPLP, PLP, INH 116
- Cinétique de la dissociation de l'INHPLP Influence des composés aminés 119
- Influence des composés aminés sur la synthèse de l'INHPLP 130

2ème partie : Stabilité des hydrazones de PLP en présence de préparations enzymatiques	136
- Stabilité de l'INHPLP en présence de DOPAdécarboxylase	136
- Stabilité des hydrazones de PLP en présence d'enzymes pures	140
- Inactivation de la DOPAdécarboxylase par le BH_4Na en présence d'hydrazones de PLP	152
3ème partie : La dissociation de l'INHPLP, au cours d'une réaction enzymatique, est-elle catalysée par l'enzyme ?	156
4ème partie : Variation du K_m de l'INHPLP, dans la synthèse enzymatique du L-tryptophane, en fonction de la concentration de la L-sérine	162
CONCLUSION	166
BIBLIOGRAPHIE	170

-O-O-O-O-O-O-

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Vu et approuvé

Paris, le 3 juillet 1970 -

Le Doyen de la Faculté des
Sciences de PARIS

Marc. ZAMANSKY

Vu
ermis d'imprimer

ecteur de l'Académie
de Paris

Robert MALLET

